



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Expresión de citoquinas de la respuesta Th2 en mucosa
intestinal de crías de alpaca**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias
Veterinarias con mención en Salud Animal

AUTOR

Cesar Abel BURGA CISTERNA

ASESOR

Alberto Gustavo MANCHEGO SAYÁN

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Burga C. Expresión de citoquinas de la respuesta Th2 en mucosa intestinal de crías de alpaca [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2016.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS MENCIÓN SALUD ANIMAL

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 15:00 horas del día jueves 30 de junio del 2016, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el Dr. Raúl Héctor Rosadio Alcántara y constituido por los siguientes miembros: Mg. Alberto Manchego Sayán (Asesor), Mg. Hugo Castillo Doloriert, Dr. Abelardo L. Maturrano Hernández, Dr. José Luis Aguilar Olano, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

"EXPRESIÓN DE CITOQUINAS DE LA RESPUESTA Th2 EN MUCOSA INTESTINAL DE CRÍAS DE ALPACA", presentado por el Bachiller en Medicina Veterinaria:

CÉSAR ABEL BURGA CISTERNA

Quien sustentó la tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias mención Salud Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación: **MUY BUENO (18)**

A continuación, el Presidente del Jurado recomendó que la Facultad de Medicina Veterinaria proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias mención Salud Animal, al Bachiller en Medicina Veterinaria **CÉSAR ABEL BURGA CISTERNA**

Siendo las 17:00 horas del día jueves 30 de junio del 2016, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

Dr. Raúl Héctor Rosadio Alcántara (P.P.T.C)
Presidente

Dr. José Luis Aguilar Olano
Miembro

Mg. Alberto Manchego Sayán (P.P.D.E.)
(Asesor)

Mg. Hugo Castillo Doloriert
Miembro

Dr. Abelardo L. Maturrano Hernández (P.A.T.C)
Miembro

Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.A.D.E.)
Director (e) de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM



A mis padres Julio y Rosa, por su apoyo
incondicional, su constante fe en mí y su
infinito amor brindado día a día.

A mi hermana Sandra y cuñado César, por su
enorme apoyo y comprensión en todas mis
etapas de aprendizaje.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Alberto Manchego, por darme la oportunidad de estar en este equipo de investigación y por brindarme su respaldo en todo momento.

A Gina Castro, por enseñarme todo lo que se con una paciencia inquebrantable.

A la doctora Nieves Sandoval, por las horas dedicadas en la elaboración de la tesis, horas que me brindo sacrificando algunos descansos.

A la Doctora Hermelinda por sus consejos, apoyo y toque maternal en el laboratorio.

A Mariel, Anita, Dennis, Guillermo, Vicente y André, por su colaboración, ánimos y los buenos momentos que hemos pasado, cada uno de una manera en particular.

Al grupo de “Pos Grado” conformado por Claudia, Alan, Elia, Laura, Sabino, Carlos, Lucelia, Ernesto, Juan, Virginia, Chen, Ofelia, Giovana, Aldo y Oscar, por los buenos momentos compartidos e innumerables anécdotas.

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar la expresión génica de las citoquinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β y el factor transcripcional GATA3 en la mucosa intestinal de crías de alpacas clínicamente sanas de 2 a 47 días de edad. Para lo cual se formaron grupos etarios conformados por alpacas de 2 a 8 días (grupo 1), 10 a 21 días (grupo 2) y 26 a 47 días de edad (grupo 3) sin importar sexo, raza y desprovistos de signos clínicos de enfermedad. Se tomó la porción media del yeyuno de cada animal de las cuales se extrajeron el ARN total y se realizó la técnica RT-PCR en tiempo real con cebadores específicos para los genes en estudio. La expresión de genes fue determinado por el método comparativo $2^{-\Delta\Delta}$ Ct usando como gen endógeno a Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y como calibrador fetos de 11 meses. La expresión de los genes de las citoquinas y el factor de transcripción se caracterizó por un temprano incremento de la expresión en todos los genes en evaluación en los animales de 2 a 8 días de edad y una mayor expresión en los animales de 10 a 21 días, asociándose al desarrollo del sistema inmune y a una respuesta estimulada por la colonización de microorganismos del ambiente. En los animales de 26 a 47 días de edad la expresión de los genes de IL-4, IL-5 y GATA3 se vio reducida ligeramente y la expresión de los genes de IL-10 y TGF- β siguió incrementándose; ambas respuestas inmunes estarían asociadas a un proceso de adaptación y regulación frente a los microorganismos saprófitos y antígenos alimenticios. Sin embargo, IL-6 sigue aumentando su expresión en los animales de 26 a 47 días de edad, asociándose a una respuesta inflamatoria contra patógenos del ambiente. El análisis histopatológico mostró un aumento de individuos con presencia de leve enteritis catarral aguda difusa al aumentar la edad, alcanzando un 84% (5/6) en los animales de 26 a 47 días de edad, asociado a la presencia de patógenos como *Cryptosporidium* spp y *Eimeria* spp encontrados en este análisis, influyendo en la expresión de los genes de las citoquinas en estudio.

Palabras clave: Alpaca, Vicugna pacos, Linfocitos Th2, Citoquinas, Intestino.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the gene expression of cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β and the transcription factor GATA3 in the intestinal mucosa of clinically healthy alpaca crias from 2- to 47-days old. Were taken alpacas of 2-to 8-days old (group 1), 10-to 21-days old (group 2) and 26-to 47-days old (group 3) regardless sex, race and without clinical signs of disease. Was sampled the midportion of jejunum of each animal. The samples were processed for obtain the total ARN and execute the real time RT-PCR with specific primers for genes of this study. Gene expression analyzing was done using the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as housekeeping gene and fetus of 11 moths was used as calibrator. The expression of cytokines gene and transcription factor was characterized by an early increased expression in all genes tested in animal from 2-to 8-days old and increased expression in animals from 10-to 21-days old, associated to the development of the immune system and the response stimulated by microbial colonization of the environment. In animals from 26-to 47-days old, the gene expression of IL-4, IL-5 and GATA3 was reduced slightly and the gene expression of IL-10 and TGF- β continued to increase, both immune responses would be associated to an adaptation process and regulation against the saprophytic organisms and food antigens. However, IL-6 continues to increase its expression in animals from 26- to 47-days old, being associated with an inflammatory response against pathogens in the environment. Histopathological study showed an increase in individuals with mild acute catarrhal enteritis diffuse with increasing age, reaching 84% (5/6) in animals from 26- to 47- days old, associated to the presence of pathogens such as *Cryptosporidium* spp and *Eimeria* spp found in this analysis, influencing the gene expression of cytokine under study.

Keywords: Alpaca, Vicugna pacos, Lymphocyte Th2, Cytokine, Intestine.

ÍNDICE

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Índice.....	iii
Abreviaturas.....	v
Lista de figuras.....	vi
Lista de cuadros	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. La alpaca.....	2
2.2. Inmunidad en Camélidos Sudamericanos.....	4
2.3. Inmunidad de mucosa intestinal	5
2.4. Inmunidad de mucosa intestinal en Alpaca	8
2.5. Células T helper.....	9
2.6. Linfocitos Th 2	11
2.7. GATA3	13
2.8. IL-4	14
2.9. IL-5	15
2.10. IL-6	16
2.11. IL-10	18
2.12. TGF-B.....	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Lugar de ejecución.....	23
3.2. Animales y muestra	23
3.3. Toma de muestra.....	25
3.4. Extracción de ARN total.....	25
3.5. PCR Tiempo Real	27
3.6. Análisis de la expresión de genes	29
3.7. Análisis histopatológico.....	30
3.8. Análisis estadístico	30
IV. RESULTADOS	31

V. DISCUSIÓN	46
VI. CONCLUSIONES	57
VII. SUGERENCIAS	58
VIII. BIBLIOGRAFÍA	60
IX. ANEXOS	75

ABREVIATURAS

APC. Antigen presenting cell.

DC: Dendritic cell.

CD: Cluster of differentiation

Ct: Ciclo threshold o ciclo umbral

CpG: Citocina-fosfato-guanina

GALT: Gut associated lymphoid tissue

GM-CSF: Granulocyte macrophage colony stimulating factor

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

ILC: Innate lymphoid cells

IRF4: Interferon regulatory factor

JAK: Janus kinase tyrosine

LT: Linfocito T

MadCAM: Mucosal vascular addressin cell adhesión molecule

MHC: Major histocompatibility complex

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells

PCR: Polymerase Chain Reaction

STAT: Signal transducer and activator of transcription

TGF- β : Transforming growth factor β

T_m: Temperatura de melting o disociación.

Th: Linfocito T helper o T colaborador

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Citoquinas involucradas en el control de la producción de inmunoglobulina A.	8
Figura 2. Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para GAPDH en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas.	31
Figura 3. Curvas de disociación (Tm) de productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen GAPDH en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas.	31
Figura 4. Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para IL-4 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas.	32
Figura 5. Curvas de disociación (Tm) de productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen de IL-4 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas.	32
Figura 6. Niveles de expresión de IL-4 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas por semanas de edad.	33
Figura 7. Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas.	34
Figura 8. Curvas de disociación (Tm) de productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen de IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas.	34
Figura 9. Niveles de expresión de IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas por semanas de edad.	35
Figura 10. Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas.	35
Figura 11. Curvas de disociación (Tm) de productos amplificados con el set	36

de oligonucleótidos para el gen de IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas.

Figura 12.	Niveles de expresión de IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas por semanas de edad.	36
Figura 13.	Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para IL-10 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas.	37
Figura 14.	Curvas de disociación (Tm) de productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen de IL-10 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas.	37
Figura 15.	Niveles de expresión de IL-10 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas por semanas de edad.	38
Figura 16.	Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para TGF- β en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas.	39
Figura 17.	Curvas de disociación (Tm) de productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen de TGF- β en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas.	39
Figura 18.	Niveles de expresión de TGF- β en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas por semanas de edad	40
Figura 19.	Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para GATA3 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas.	40
Figura 20.	Curvas de disociación (Tm) de productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen de GATA3 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas.	41
Figura 21.	Niveles de expresión de GATA3 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas por semanas de edad.	41
Figura 22.	Expresión de GATA3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y TFG- β en mucosa intestinal de crías de alpacas clínicamente sanas. Las	42

líneas representan la media de la expresión en los diferentes grupos etarios evaluados.

Figura 23.	Yeyuno de alpaca de 8 días de edad	43
Figura 24.	Yeyuno de alpaca de 47 días de edad.	44
Figura 25.	Porcentaje de crías de alpacas clínicamente sanas con lesiones histopatológicas en yeyuno.	44

ANEXOS

Figura A1.	Resultados software STATA 11: Prueba de Shapiro wilk, Kruskal – Wallis y U Mann - Whitney para IL-4 en los diferentes grupos etarios.	83
Figura A2.	Resultados software STATA 11: Prueba de Shapiro wilk, ANOVA y Bonferroni para IL-5 en los diferentes grupos etarios.	84
Figura A3.	Resultados software STATA 11: Prueba de Shapiro wilk, ANOVA y Bonferroni para IL-6 en los diferentes grupos etarios.	84
Figura A4.	Resultados software STATA 11: Prueba de Shapiro wilk, ANOVA y Bonferroni para IL-10 en los diferentes grupos etarios.	85
Figura A5.	Resultados software STATA 11: Prueba de Shapiro wilk, ANOVA y Bonferroni para TGF- β en los diferentes grupos etarios.	85
Figura A6.	Resultados software STATA 11: Prueba de Shapiro wilk, ANOVA y Bonferroni para GATA3 en los diferentes grupos.	86

LISTA DE CUADROS

	Pag
Cuadro 1. Características etarias de los grupos de estudios asignados en el estudio.	24
Cuadro 2. Cebadores empleados para la técnica RT-PCR Tiempo real.	36
Cuadro 3. Niveles de Expresión de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β y GATA3 en mucosa intestinal en crías de alpacas clínicamente sanas en los diferentes Grupos Etarios.	42
Cuadro 4. Frecuencia de lesiones histopatológicas por grupos etarios en yeyuno de crías de alpaca clínicamente sanos.	45

ANEXOS

Cuadro A1. Resultados de la cuantificación relativa de IL-4 de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador.	75
Cuadro A2. Resultados de la cuantificación relativa de IL-5 de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador.	76
Cuadro A3. Resultados de la cuantificación relativa de IL-6 de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador.	77
Cuadro A4. Resultados de la cuantificación relativa de IL-10 de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador.	78
Cuadro A5. Resultados de la cuantificación relativa de TGF- β de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador.	79
Cuadro A6. Resultados de la cuantificación relativa de GATA3 de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador.	80
Cuadro A7. Resultados del estudio histopatológico de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpaca clínicamente sanas con tinción H:E	81

I. INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos son animales domésticos ancestrales de gran importancia económica, social y cultural siendo una de las principales fuentes económica del poblador alto andino y el animal más adaptado al ecosistema de esta región. Sin embargo, uno de los principales limitantes para el buen desarrollo de la crianza de la alpaca son los problemas entéricos de origen infeccioso que representan un gran porcentaje de morbilidad y mortalidad en las crías, reduciendo la eficiencia productiva y generando grandes pérdidas económicas a los criadores (Ameghino 1991).

Los diversos problemas entéricos de origen infecciosos son controlados por la inmunidad de mucosa intestinal. Esta es la primera línea de defensa frente a la colonización y proliferación de patógenos; sin embargo, todavía se conoce poco sobre el desarrollo y establecimiento de la respuesta inmune de mucosas en alpacas. A pesar de existir estudios anteriores de algunas citoquinas, solo evalúan 2 citoquinas por trabajo, siendo ese su principal limitante. Por esta razón, se forma un gran proyecto en el que se investiga en conjunto la expresión genética de las principales citoquinas del perfil Th1, Th17, Th2 y la evaluación de la respuesta inmune frente a diferentes inmunógenos en mucosa intestinal en crías de alpacas, siendo el presente estudio enfocado solo en la evaluación de citoquinas de la respuesta inmune humoral (perfil Th2) en mucosa intestinal de crías de alpaca. Este estudio se realiza como línea base para la descripción de la cinética normal del desarrollo inmunológico y como base para la generación de alternativas terapéuticas y preventivas que se valgan de estos mecanismos a fin de mejorar la respuesta inmune y controlar eficientemente a los agentes patógenos. Asimismo, este trabajo incluye un análisis histopatológico con la finalidad de conocer el estado del intestino de los animales en estudio.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. La alpaca

La alpaca (*Vicugna pacos*) es un camélido sudamericano doméstico que constituye un recurso genético de gran importancia social, económica y cultural para las regiones alto andinas de Sudamérica. Provee productos de alta calidad, como son la fibra y la carne, produciéndolas con gran eficiencia a pesar de contar solo con pastos pobres propios de las alturas. Además, ofrece subproductos como pieles y cueros que tienen múltiples usos industriales y artesanales. A menudo, constituye el único medio de subsistencia de un vasto sector de la población alto andina donde no es posible la agricultura ni la crianza de otras especies de animales domésticos (FAO, 2005).

Las alpacas se clasifican taxonómica en Reino *Animalia*, Filo *Chordata*, Clase *Mammalia*, Orden *Artiodactyla*, Suborden *Tylopoda*, Familia *Camelidae*, Tribu *Lamini*, Género *Vicugna*, Especie *Vicugna pacos*. Estudios de ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial y microsatélites han sugerido que la vicuña (*Vicugna vicugna*) es el ancestro de la alpaca (*Vicugna pacos*) y el guanaco (*Lama guanicoe*) es el ancestro de la llama (*Lama glama*) (Kadwell *et al.* 2001).

Existen dos razas de alpacas, la raza Huacaya y la raza Suri. La raza Huacaya es la más abundante correspondiendo al 80% del total de alpacas en el Perú y se caracteriza por tener fibra de crecimiento perpendicular al cuerpo. La raza Suri tiene una menor población y se caracteriza por tener fibra lacia, ligeramente ondulada que cae a los costados del animal (Pezo, 2010).

El Perú tiene una población total de 3'685,542 cabezas. La población de alpacas de raza Huacaya es 2'909,212 y la de raza suri es de 442,013. El 55% de la población de alpacas se encuentran en el departamento de Puno y la diferencia del 45% se encuentra en los

departamentos de Cusco, Huancavelica, Arequipa, Ayacucho, Apurímac, Moquegua, Tacna, Junín, Lima, Pasco, Cajamarca y Ancash (INEI, 2012).

Uno de los principales limitantes para el desarrollo económico de las actividades pecuarias en el mundo andino son las enfermedades infecciosas, siendo las de mayor impacto sanitario los procesos entéricos y las neumonías agudas de origen multifactorial, produciendo una elevada mortalidad principalmente en neonatos hasta 30 días de edad. (Ameghino y DeMartini, 1991). La mortalidad neonatal asociada a procesos infecciosos entéricos está relacionada a un grupo de patógenos denominado complejo entérico neonatal. Este complejo está constituido por *Clostridium perfringens* tipo A y C como el agente prevalente en fatalidades asociadas con enterotoxemia, cepas de *E. coli* patogénicas (enteropatógenicas y enterohemorrágicas), *Giardia intestinalis* coexistiendo con cepas de *E. coli* enteropatógenicas, *Eimeria* spp, *Cryptosporidium* spp así como un coronavirus similar al virus bovino (Rosadio *et al.*, 2012).

Entre las enfermedades entéricas más importantes que afectan a las alpacas, tenemos a la enterotoxemia. La enterotoxemia produce elevadas tasas de mortalidad neonatal, pudiendo llegar hasta el 70% en algunos centros de crianza alpaquera del Perú. El agente causante de la enfermedad es el *Clostridium perfringens*, siendo el tipo A el más involucrado; aunque también han sido reportados los tipos C. La virulencia de esta especie está dada por la presencia de exotoxinas, las cuales también determinan el genotipo de la cepa. Así, el tipo A posee sólo la toxina α ; el tipo B las toxinas α , β y ϵ ; el tipo C las toxinas α y β ; (Hurtado, 2011).

Las investigaciones realizadas sobre enterotoxemia de las alpacas en el Perú demostraron que la mayoría de las cepas son de *Clostridium perfringens* tipo A, conteniendo únicamente el gen *cpa* de la toxina α . Solamente el 0.4% tiene genes *cpa* y *cpb* de las toxinas α y β (genotipo C). En análisis paralelo, se encontró que el 8.5% de los genotipos A contenían adicionalmente el gen *cpb2*, pero ninguna cepa tenía el gen *cpe* de la enterotoxina. Estos resultados evidencian que las exotoxinas secretadas, y no las endotoxinas (*cpe*), serían los probables factores de virulencia clostridiales en la enterotoxemia de la alpaca. Adicionalmente, en el análisis histopatológico de intestinos afectados por la enterotoxemia, el 30.6% de las muestras presentó abundantes estructuras parasitarias inmaduras correspondientes a *Eimeria macusaniensis*, afectando la mucosa y

epitelio de las glándulas crípticas intestinales, sugiriendo a las infecciones coccidiales como uno de los posibles factores desencadenantes de la enterotoxemia (Rosadio *et al.*, 2012).

2.2. Inmunidad en Camélidos Sudamericanos

Los camélidos sudamericanos como especie han demostrado poseer características únicas que lo diferencian de las demás especies de mamíferos. Asimismo, el sistema inmune no es diferente a esta situación, mostrando algunas características únicas.

Las inmunoglobulinas de camélidos difieren estructuralmente de las inmunoglobulinas tradicionales al carecer de la cadena ligera y de la primera región constante de su cadena pesada (CH1), por lo que son denominados anticuerpos de cadena pesada o heavy-chain antibodies (HCAbs). En todos los camélidos la IgG tiene 3 subtipos, la IgG1 con estructura convencional de anticuerpo (con cadenas pesadas y ligeras) correspondiendo al 25% de IgG sérica, las IgG2 e IgG3 que carecen de cadenas ligeras y están presentes en 75% de la IgG sérica en camellos y en 50% en llamas (Daley *et al* 2005). En el año 2000, Harmsen *et al* investigan la estructura de las inmunoglobulinas de Llama, encontrándolas funcionales y carentes de la cadena ligera y de la primera región constante de la cadena pesada (CH1), al igual que en otros camélidos; esta característica brinda al dominio variable de la cadena pesada una región adyacente a la bisagra. La región variable es denominada variable domains of the HCAbs o dominio variable de las HCAbs (VHH). La ausencia de la región variable de la cadena ligera es compensado por las regiones determinantes de la complementariedad extendida o complementarity-determining regions (CDR) que provee una adecuada unión a la superficie del antígeno y demuestra afinidad comparable con los anticuerpos convencionales (De gens *et al.*, 2006).

A pesar del pequeño tamaño de las inmunoglobulinas de camélidos y más aún que los homodímeros del VHH forman un parátipo más pequeño que las inmunoglobulinas convencionales, la especificidad y afinidad es comparable con las de otras inmunoglobulinas convencionales. Este pequeño tamaño y su estructura le otorgan ventajas terapéuticas como una rápida penetración tisular, una fácil manipulación genética debido a que están constituidos por un solo gen, alta estabilidad fisicoquímica debido a su eficiente

plegamiento, reconocimientos de sitios antigénicos ocultos debido a su pequeño tamaño y su flexible CDR3. Estas Inmunoglobulinas son usadas como tratamiento de diversas enfermedades como el mal del sueño (*Trypanosoma cruzi*), diarrea infantil (*Rotavirus*), diarrea de los lechones (*Escherichia coli*) (Harmsen y De Haard, 2007) y mostrando una excelente capacidad de neutralización contra el virus de VIH (McCoy *et al.*, 2014).

A pesar de ser animales con características únicas, la composición leucocitaria es similar a la de los bovinos, compuesto principalmente por células B (sIg⁺) (31%±8 S.D), células T αβ (27%±12 S.D.), células T γδ WC1⁺ (16%±11 S.D.) y monocitos (5–16%) (Davis *et al.*, 2000). Siendo los parámetros celulares sanguíneos normales en llamas los siguientes: Eritrocitos 10.8 – 17.1 x 10⁶/μl, leucocitos 7.5 – 23.8 x 10³/μl, plaquetas 200 – 600 x 10³/μl (Wernery, 1995)

Así como en los bovinos, equinos y ovinos, los camélidos sudamericanos tienen una placenta epiteliocorial el cual no permite la transmisión materno-fetal de Igs durante la gestación. Por esta razón, los camélidos sudamericanos nacen hipogammaglobulinémicos teniendo valores de IgG en plasma indetectables, siendo el epitelio intestinal de los camélidos un importante medio de absorción de grandes moléculas como las Igs durante las primeras 24 horas de vida (Fowler y Olander, 1990). Vale la pena mencionar que la vida media de la IgG calostrale en plasma de una llama recién nacida es de 15.7 días, siendo este valor similar para las alpacas (Weaver *et al.*, 2000). Por otro lado, la concentración en plasma de las HCABs declina más rápidamente que la IgG convencional. Las HCABs (IgG2 e IgG3) se reducen en un 50% en 14 días, mientras que la IgG1 se reduce en un 50% en 20 a 25 días (Daley-Bauer *et al.*, 2010). Caggiano *et al* en el 2014 encuentra que el calostro de alpacas tiene en promedio 17.03mg/ml de IgM, 42.55 mg/ml de IgG total, 24.35mg/ml de Ig G1 y 18.19 mg/ml de HCABs, siendo Ig G1 el más abundante en el calostro y las HCABs la segunda fracción más importante.

2.3. Inmunidad de mucosa intestinal

La inmunidad de mucosa intestinal es el sistema inmune más complejo y abundante de los seres vivos. Tiene una importante función de discriminación entre los microorganismos patógenos, microorganismo de la flora comensal y antígenos inocuos propios de la dieta alimenticia. (Fainboim y Geffner, 2011).

La inmunidad innata de la mucosa intestinal está compuesta por una eficiente barrera epitelial compuesta de enterocitos, células caliciformes y células de Paneth que trabajan colectivamente para reducir la carga bacteriana en la interfaz entre el lumen y el epitelio. La barrera epitelial separa el lumen intestinal altamente colonizado de la lámina propia. La lámina propia es un tipo especial de tejido conectivo que es prácticamente estéril y contiene varias células inmunes. El epitelio maximiza la absorción de nutrientes al tiempo que evita el paso de componentes inadecuados (microorganismos y alimentos pro inflamatorios) a través de uniones estrechas que unen a los enterocitos obteniendo una barrera impermeable. Además, las células de Paneth y células caliciformes en el epitelio contribuyen a las defensas inmunitarias apoyando la función de barrera epitelial. Las células de Paneth se localizan en las criptas y producen una gran variedad de agentes antimicrobianos tales como defensinas, criptidinas y catelicidinas que impiden el contacto cercano de los microorganismos con las células proliferativas en las criptas. Las células caliciformes producen mucinas que forman una capa protectora sobre el epitelio y evitan el contacto directo con microorganismos lumbinales (Bron *et al.*, 2012).

La inmunidad adaptativa en la mucosa del intestino está constituida por el GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*) y se divide en organizado y difuso. El GALT organizado, con una importante función inductora, está constituido por folículos linfoides aislados y folículos linfoides asociados como las placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos. El GALT difuso, con una importante función efectora de la respuesta inmune, está conformado por poblaciones de linfocitos dispersas en el entramado epitelial (linfocitos intraepiteliales) o en la lámina propia intestinal (linfocitos de la lámina propia) (Mowat *et al.*, 2004). En los corderos, las placas de Peyer ileocecales son órganos linfoides primarios e incrementan de tamaño desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad, para involucionar desde entonces; por el contrario, las placas de Peyer yeyunales son órganos linfoides secundarios y persisten sobre toda la vida del adulto (Tizard, 2013).

Los antígenos lumbinales pueden penetrar la mucosa intestinal y alcanzar el GALT a través de distintas vías. La entrada a través de células M constituye la vía más importante localizado en el epitelio asociado a folículos linfoides, no desempeñan ningún papel en la digestión o absorción ya que han reducido el borde en cepillo en la superficie apical y la falta de actividad enzimática; además, presenta membrana apical diseñada para favorecer la adhesión y captación de antígenos lumbinales como macromoléculas, partículas

adhesivas, inmunoglobulinas, virus y bacterias. La internalización de los antígenos lumenales por las células M se realiza mediante endocitosis y se transportan a través de vesículas hacia la membrana basolateral, este proceso depende de la temperatura inhibiéndose a 25 °C o menos. La membrana basolateral presenta una invaginación que alberga células presentadoras de antígenos y linfocitos (Deshmukh *et al.*, 2012). Los enterocitos también son capaces de captar, procesar y presentar antígenos solubles que llegan a la superficie celular (Hershberg y Mayer, 2000). La captación de antígenos lumenales también puede producirse mediante un mecanismo paracelular, donde las células dendríticas proyectan sus dendritas hacia el lumen intestinal. (Rescigno *et al.*, 2001).

El GALT contiene diferentes tipos de leucocitos y estos drenan a los ganglios linfáticos mesentéricos. Las placas de Peyer y folículos linfoides aislados, ubicados a lo largo del intestino, contienen los tipos de células necesarias para generar una respuesta inmune incluyendo células dendríticas, macrófagos, linfocitos B y T. Los ganglios linfáticos mesentéricos drenan a través de vasos linfáticos aferentes de estas áreas y proporcionan un lugar para la respuesta inmune adquirida contra la microbiota intestinal. Los linfocitos activados en estos sitios inductivos migran fuera del GALT a través del conducto torácico, entran a la circulación y migran a diferentes tejidos linfoides asociados a mucosa (MALT). Los linfocitos vuelven a los GALT donde fueron activados, debido a la presencia de integrinas $\alpha 4\beta 7$, que se unen a la proteína MadCAM -1 expresada en las células endoteliales de las vénulas post capilares en la lámina propia del intestino (Green- Johnson, 2012).

La exclusión inmune es un proceso en el cual se evita la invasión de microorganismos a través de la producción de IgA, este proceso es mediado por citoquinas secretadas por las células Th2. Las citoquinas involucradas en este proceso son TGF- β , citoquina clave para inducir el cambio de isotipo para la producción de IgA; IL-4 e IL-5, estimulando la proliferación de células B activadas; IL-6, es esencial para la diferenciación a células plasmáticas (Tizard, 2013); IL-10 también de importante rol en este proceso de diferenciación y multiplicación (Itoh y Hirohata, 1995) (Figura 1).

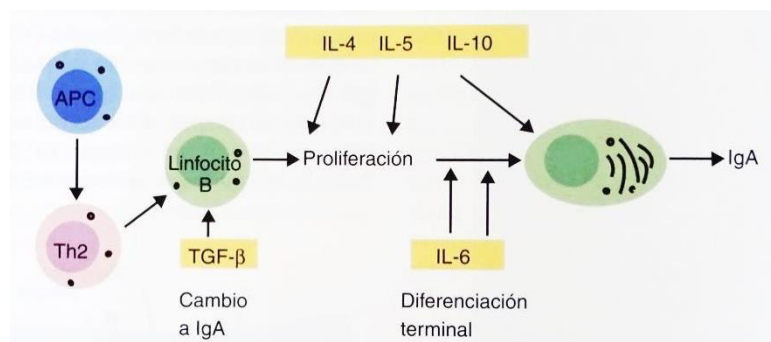


Figura 1. Citoquinas involucradas en el control de la producción de inmunoglobulina A (Tizard, 2009).

2.4. Inmunidad de mucosa intestinal en Alpacas

Las alpacas se enfrentan constantemente a diferentes patógenos entéricos, los cuales se encuentran asociados constantemente, provocando enteropatías con altas tasas morbilidad y mortalidad. Por esta razón, se han realizado diversas investigaciones con el fin de elucidar los mecanismos de defensa inmune en el intestino de alpacas, sin embargo todavía son muchas las dudas por resolver.

More *et al* en el 2011, estudia la expresión de péptidos antimicrobianos (α y β defensinas) en mucosa yeyunal de alpacas clínicamente sanas de 1 a 7 semanas de vida, encontrando una expresión ascendente a partir de la 3era semana de vida aproximadamente, posterior a esta semana se encuentra un descenso en la expresión en la 5ta semana de vida y a partir de esta semana se encuentra una expresión constante hasta la 7ma semana de vida, mostrando una fuerte respuesta inmune inicial para luego pasar por un proceso de adaptación, encontrando un equilibrio a partir de la 5ta semana. Siuce *et al* en el 2015, también estudia la expresión de α y β defensina pero en mucosa yeyunal de crías de alpacas con enteropatías, encontrando una expresión muy variada y elevada. La misma cinética de expresión encontrada por More *et al* en el 2011 al evaluar la expresión de péptidos antimicrobianos es encontrada también por Bardález *et al* en el 2013 al evaluar la expresión de IL-1 y TNF- α , Chiok en el 2012 al evaluar la expresión de IL-4, IL-10, IL-2 e IFN- γ , Herrera en el 2012 al evaluar la expresión IL-17 y TGF- β y Dionisio en el 2014 al evaluar la expresión de la IgA en mucosa yeyunal de crías de alpacas de 1 a 6 semanas de vida, evidenciando que tanto la inmunidad innata como adquirida sigue este comportamiento.

La expresión de citoquinas en yeyuno de alpacas en el primer mes de vida muestra una polarización hacia un perfil Th1. Chiok en el 2012, encontró una muy elevada expresión de IFN- γ con respecto a IL-4 e IL-10; sin embargo, la expresión de IgA también se muestra elevada al transcurrir las semanas (Dionisio *et al*, 2014), mostrando que a pesar de existir un predominio Th1, la expresión de Inmunoglobulinas no se ve afectada. Esto también se confirma por Reyes en el 2015 al analizar la expresión de IgA en mucosa yeyunal de alpacas clínicamente sanas hasta los 56 días de edad, mostrando una expresión ascendente al aumentar la edad, a pesar de existir un predominio Th1.

Otros estudios muestran como la respuesta inmune de las alpacas se ve influenciada al ser estimuladas con antígenos clostridiales. Watanabe *et al* en el 2014 encuentra en los leucocitos sanguíneos de alpacas una elevada expresión de IL-10 con respecto a IL-2 frente a la presencia de antígenos clostridiales. More en el 2013, encuentra una elevada expresión de IFN- γ , TNF- α e IL-2 frente a antígenos clostridiales y ácido retinoico en leucocitos sanguíneos de alpaca; sin embargo, IL-4 e IL-10 no mostraron diferencias en su expresión. Reyes en el 2015 muestra que la presencia de antígenos clostridiales vía oral aumenta de manera considerable la expresión de IgA en mucosa intestinal de alpacas; sin embargo, la expresión de las citoquinas IL-5, IL-6 y TGF- β no se ven influenciadas.

2.5. Células T helper

La diferenciación de las células T CD4 + vírgenes en distintos subgrupos de células T helper es crucial para la defensa adecuada del hospedero y la inmunorregulación. Estos subgrupos se diferencian mediante señales extrínsecas e intrínsecas que son reforzados por las modificaciones epigenéticas resultando en poblaciones celulares de diferentes fenotipos. En consecuencia, estos subconjuntos se han visto como linajes que se definen por la expresión de selectivas citoquinas claves y factores de transcripción maestros (Nakayamada *et al.*, 2012).

El destino de la diferenciación de las células Th y su producción de citoquinas esta mediado por los factores de transcripción maestros y las proteínas STAT (signal transducer and activator of transcription). Tras la activación del TCR desencadenada por células presentadoras de antígeno, las células T CD4+ vírgenes se diferencian en distintos linajes Th según la combinación de citoquinas que regulan la estimulación positiva de factores de

transcripción maestros y activación de proteínas STAT. Cada linaje expresa receptores de citoquinas únicas, que pueden responder a las citoquinas producidas por las células accesorias. El factor de transcripción maestro induce factores de transcripción secundarios, colaborando juntos para aumentar la expresión de citoquinas y sus receptores; en algunos casos, el factor de transcripción maestro también promueve su propia expresión. La producción de citoquinas y la expresión elevada de receptores de citoquinas proporcionan potentes señales de retroalimentación positiva para la diferenciación de cada linaje de célula Th y su expansión (Zhu y Paul, 2008).

Cada linaje de células Th tiene una función especializada y está caracterizada por la producción de citoquinas claves y su respectivo factor transcripcional. Las células Th1 se caracterizan por la producción de IFN- γ y están implicadas en la inmunidad celular contra los microorganismos intracelulares. IL-12 producida por las células inmunes innatas, así como IFN- γ producidos tanto por las células NK y células Th1, estimulan la diferenciación de células TCD4⁺ vírgenes a células Th1 a través de la acción STAT4, STAT1 y T-bet. Las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-13, siendo necesarios para la inmunidad humoral contra patógenos extracelulares y para el control de helmintos; además de participar en reacciones alérgicas. La diferenciación de células Th2 requiere la acción de IL-4, que actúa sobre STAT6 y GATA3. Células Th17 producen IL-17 e IL-22 y juegan un papel importante en el control de bacterias extracelulares y hongos, especialmente en las superficies mucosas. La diferenciación de células Th17 requiere de ROR γ T, un factor de transcripción que es inducida por TGF- β en combinación con las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-21 e IL-23 activando la fosforilación de STAT3 (Zhou *et al.* 2009).

Las células Th reguladoras (Treg) juegan un rol central en el mantenimiento de auto tolerancia y la regulación de la respuesta contra antígenos. Se caracterizan por la expresión del factor transcripcional FoxP3 y STAT5 estimulados por las citoquinas TGF- β e IL-2 (Whiteside, 2012). Se reconocen 2 categorías mayores de células T reguladoras Foxp3⁺: Las células Treg naturales CD4 + CD25 + (nTreg) que se presentan en el timo y las células iTreg (células T reguladoras inducidas) inducidas por TGF- β producido en la periferia, ambos tipos de células Treg pueden participar en el mantenimiento de la tolerancia periférica y la prevención de la autoinmunidad (de Lafaille & Lafaille, 2009).

Las células Th9, Th22 y TFH se han descrito recientemente y son subgrupos que tienen distintos requisitos funcionales y de diferenciación en comparación a los subtipos de células T CD4+ ya establecidos. Las células Th9 producen IL-9, a menudo descrito como una citoquina derivada de Th2, desempeña un papel en la inmunidad antihelmíntica y también es responsable de gran parte de la patología que se produce durante la inflamación alérgica. Se ha demostrado recientemente que la IL-9 que producen células T CD4 + representan una población distinta de las células Th2 productoras de IL-4. La inducción de células Th9 puede ser impulsado por una combinación de TGF- β e IL-4, activando el factor transcripcional maestro PU.1; estas células Th9 participan en la inmunología tumoral. Las células Th22 producen IL-22 cuya función es estimular la producción de péptidos antimicrobianos por las células epiteliales para mejorar la función de barrera mediante la promoción de la reparación del epitelio y para proteger contra la inflamación intestinal. La diferenciación de células Th22 es impulsada por IL-6, IL-13 y TNF- α en ausencia de TGF- β , estas citoquinas activan el factor transcripcional maestro AhR. Células Tfh producen IL-21 y promueven el desarrollo de centros germinales, estimulando la proliferación y diferenciación de células B a células plasmáticas o células de memoria. La diferenciación de estas células requiere la citoquina IL-21 e IL-6 teniendo como factor transcripcional maestro a Bcl-6 (Walsh y Mills, 2013; Brucklacher *et al.*, 2014).

2.6. Linfocitos Th 2

Las células Th2 se caracterizaron inicialmente por la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13. Aunque las células Th2 pueden expresar muchas otras citoquinas como la IL-2, IL-3, IL-9, IL-6, IL-10, GM-CSF y TNF- α ; estas citoquinas se expresan también por otros linajes de células T CD4+. Por lo tanto las originales 3 citoquinas (IL-4, IL-5 e IL-13) siguen siendo las citoquinas Th2 establecidas (Prussin *et al.*, 2010).

Las células Th2 tienen la función de mediar la inmunidad humoral y son esenciales para la erradicación de gusanos parásitos, además de participan en reacciones alérgicas. La producción de las citoquinas depende del factor transcripcional GATA3, que es rápidamente inducido por IL-4 a través de STAT6 (de Almeida *et al.*, 2009). Las células Th2 promueven la activación y la multiplicación de células B (IL-4 e IL-5) y la diferenciación a células plasmáticas (IL-6 e IL-10), estimulan la producción de IgE a través

de la IL-4 e IgA junto con TGF- β , reclutan eosinófilos a través de IL-5, activan mastocitos (IL-9) y actúa sobre las células epiteliales (IL-9 e IL-13) (Zhu, 2010).

La citoquina IL-4 es el factor determinante para la diferenciación Th2. IL-4 se une al receptor de IL-4 (IL-4R) resultando en reclutamiento, fosforilación, dimerización y translocación de STAT6 al núcleo, activando el factor de transcripción GATA3, que se considera como un regulador maestro Th2. Las señales del TCR y de receptores coestimuladores son importantes para la diferenciación Th2 y la producción de IL-4 mediante la regulación de la expresión de NFAT, proteína activadora-1, proteína JunB y la proteína IRF4 (sahoo *et al.*, 2014).

Existen vías alternativas de diferenciación hacia un perfil Th2 independientes de IL-4. La intensidad de la señal del TCR regula la diferenciación de células Th2, una débil señalización del TCR favorece la diferenciación de células Th2 y una fuerte señal a Th1. La débil estimulación TCR induce la expresión de GATA3 independiente de IL-4 y la produce tempranamente (Paul y Zhu., 2010). La IL-2 juega un rol central en el proceso de diferenciación hacia el fenotipo Th2. Células STAT5^{-/-} mostraron disminuir la producción de IL-4, mientras que *in vivo* neutralización de IL-2 inhibe la producción de IL-4 (Cote-Sierra *et al.*, 2004). Los receptores tipo NOTCH (tipo 1 y 3) también regulan la expresión de GATA3 a través de la unión de sus ligandos JAGGER (tipo 1 y 2) mostrados por las APC (antigen presenting cell). El receptor NOTCH se internaliza y va hacia el núcleo cooperando con proteínas RBPJ y otros cofactores como MAML1 activando la transcripción de GATA3. Un aumento excesivo de IL-4 anularía la ruta de receptores NOTCH para la generación de células Th2 *in vitro* (Amsen *et al.*, 2009).

Estudios realizados demuestran que las células del sistema innato contribuyen a la diferenciación hacia un perfil Th2. Las células asesinas naturales T (NKT) producen grandes cantidades de IL 4 que pueden iniciar una respuesta Th2 (Akbari *et al.*, 2003). Se sabe también que los basófilos son una fuente inicial de IL-4 e IL-13 en presencia de nematodos y reacciones alérgicas (Min *et al.*, 2004). Células epiteliales producen TSLP (thymic stromal lymphopoietin), IL-33 y IL-25 (también conocido como IL 17E) ejecutando una función reguladora en la inmunidad de mucosa promoviendo la respuesta Th2 (Bulek *et al.*, 2010).

También se ha descubierto que los linfocitos B estimulan la diferenciación de las células TCD4+ vírgenes a Th2 a través de 3 mecanismos. En primer lugar, las células B, pueden presentar antígenos y proporcionar señales coestimuladoras específicas a las células T, proceso realizado sin la presencia de IL-12, iniciando y sosteniendo el desarrollo Th2. Segundo, las células B producen citoquinas como IL-2 e IL-10 que actúan sobre las células T o DCs para promover el desarrollo Th2 y la diferenciación a otros linajes. Finalmente, las células B pueden alcanzar las células LT / CXCL13 en la región interfolicular de los linfonódulos y facilitar la colonización de DCs y otras células T CD4+ propiciando un microambiente que parece favorecer el desarrollo de Th2 (León *et al.*, 2014).

2.7. GATA3

Los factores de transcripción GATA juegan un rol crucial en la red de genes reguladores que rigen la especificidad de destinos celulares. La familia GATA se compone de seis factores de transcripción altamente conservados que unen a la secuencia de ADN (A / T) GATA (A / G) a través de dos dominios de dedos de zinc con la secuencia de consenso CX₂CX₁₇CX₂C. GATA1, GATA2 y GATA3 están vinculados en la diferenciación de células hematopoyéticas, mientras que GATA4, GATA5, y GATA6 juegan papeles cruciales en la diferenciación de los tejidos endodérmicos, incluyendo el corazón y los pulmones. El factor transcripcional GATA tiene diferentes funciones como el papel de GATA1 en la eritropoyesis, GATA3 en células T y la diferenciación de Th2, GATA4 en la diferenciación epitelial cardíaco y gástrico y GATA6 en la diferenciación epitelial de pulmón (Kouros-Mehr *et al.*, 2008). El factor GATA ha sido identificado en mamíferos, peces, aves, insectos, hongos y plantas (He *et al.*, 2007).

GATA3 es un factor de transcripción que actúa como un regulador maestro de la diferenciación Th2 aumentando la expresión de los genes de citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13. Actúa interactuando directamente con los promotores de los genes diana, reestructura la cromatina abriendo el locus para que sea accesible a otros factores de transcripción y aumenta su propia expresión a través de una retroalimentación positiva. GATA3 bloquea la diferenciación Th1 inhibiendo la expresión de la cadena transmisora de señales del receptor para la IL-12. Los ratones que carecen de los genes de IL-4, STAT6 o GATA3 tienen respuestas Th2 deficientes (Abbas *et al.*, 2015).

La expresión de GATA3 es promovida principalmente por la Vía IL4-IL4R-STAT6 (Kaplan *et al.*, 1996); sin embargo, otros estudios demuestran que existen otras vías de activación. La débil activación del TCR estimularía la expresión de GATA3 y permitiría una diferenciación hacia un perfil Th2 (Tao *et al.*, 1997). IL-2 también estimularía la expresión de GATA3 a través de STAT5 en células TCD4+ activadas. (Yanane *et al.*, 2005). Los últimos estudios demuestran que las señales Wnt and Notch también regulan la expresión de GATA3 a través de la activación de la señal Wnt–Frizzles, que induce la acumulación de β -cateninas en células Th2 y promueve la transcripción de GATA3 por reclutamiento especial de la secuencia de unión rica en AT (Sabt1), β -cateninas y la histona acetiltransferasa p300 al promotor de GATA3. Además, la señalización Notch es activada en células T CD4+ promoviendo la transcripción de GATA3 y la diferenciación Th2 independiente de la señalización IL-4/STAT6 (Wan, 2014).

GATA3 además de ser el factor transcripcional maestro para la diferenciación Th2, también contribuye a la regulación del desarrollo y función de otras células. Durante la timopoiesis, GATA3 suprime células B potenciales en prematuras células T precursoras, activando la señalización del TCR en las pre células T y promoviendo el linaje de células TCD4+ después de la selección positiva. GATA3 también tiene funciones fuera del timo en células madre hematopoyéticas, células T reguladoras, células T CD8 +, células NK e ILC 2 (Tindemans *et al.*, 2014).

2.8. IL-4

IL-4 tiene un papel importante en la regulación de la producción de anticuerpos, la hematopoyesis, la inflamación y el desarrollo de células Th2 efectoras. Es producida por un grupo de células hematopoyéticas activadas, incluyendo las células T, mastocitos Fc epsilon R1+, basófilos (Brown y Hural, 1997), Eosinófilos (Moqbel *et al.*, 1995) e ILC 2 (Neill *et al.*, 2010).

Interleucina 4 es una citoquina de 4 hélices alfa altamente polifuncional. A pesar de existir muchos estudios, es probable que la gama completa de funciones de estas citoquinas todavía no se conozca ya que la distribución de los receptores de IL-4 es extremadamente amplia; sugiriendo que muchos tipos de células muestran respuestas a esta citoquina. Sus

primeros estudios fueron en los años 70 como una citoquina que aumentaba la respuesta proliferativa de células B; inicialmente fue nombrada factor de crecimiento de células B (BCGF), posteriormente fue renombrada factor estimulador de células B-1 (BSF-1) y finalmente cuando fue molecularmente clonada se le dio el nombre definitivo de IL-4. En 1988 el gen de IL-4 fue encontrado en el cromosoma 11 de ratón y en el cromosoma 5q31 en el humano (Paul, 2015).

Los receptores de IL-4 son heterodímeros constituidos principalmente por la cadena IL-4R α . Los receptores IL-4 tipo I son utilizados exclusivamente por IL-4, conformado por IL-4R α y la cadena γ c; mientras que los receptores tipo II, pueden ser utilizados tanto por IL-4 e IL-13, conformados por IL-4R α con IL-13R α 1. IL-4R α se expresa ampliamente en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas, pero γ c se limita en gran medida a las poblaciones hematopoyéticas (Redpath *et al.*, 2015). Existen menos de 100 receptores para IL-4 en células B y T en reposo, aumentando 5 a 10 veces al ser activados; macrófagos y mastocitos tienen menos de 2000 receptores por célula (Park *et al.*, 1987).

IL-4 se une a su receptor para activar la vía JAK-STAT e IRS-1 / IRS-2 para inducir la diferenciación y la proliferación de células Th2, la síntesis de inmunoglobulina E, la activación de macrófagos y la producción de colágeno de los fibroblastos. La unión de IL-4 con su receptor resulta en activación de JAK 1 y JAK 3. La activación de JAKs resulta en la fosforilación de las tirosinas citoplasmáticas de IL-4R α , lo que conduce al reclutamiento de STAT6 con el receptor, seguido por la fosforilación y la activación de STAT6 (Kelly-Welch *et al.*, 2003).

2.9. IL-5

IL-5 es una glucoproteína homodimérica con dominio de cuatro hélices α que tiene como principales funciones regular el reclutamiento, activación, crecimiento, diferenciación y supervivencia de eosinófilos y basófilos; induce la diferenciación y proliferación de linfocitos B-2 activados en células secretoras de inmunoglobulinas; induce el crecimiento de células progenitoras B CD5+ (B-1) y producción de Ig M por el mismo tipo de células (Takatsu, 1998); prolonga la supervivencia, actividad efectora y quimiotáctica de eosinófilos e incrementa la adhesión a células endoteliales (Sanderson, 1992).

Originalmente, IL-5 fue descrito como una forma de factor reemplazante de células T (TRF) por Takatsu *et al* en 1988, un factor de crecimiento de células B (BCGFII) por Swain en el mismo año y un factor de diferenciación de células B (BCDFp) por Vitetta en 1984, un año después el grupo de Takatsu encontró que TRF y BCGFII eran idénticos. Aproximadamente al mismo tiempo, un trabajo sobre factores estimulantes de colonias condujo a la identificación de un factor de diferenciación de eosinófilos murino (EDF) por medio de un sistema de cultivo de médula ósea líquida. En 1986 EDF se purificó y demostró ser idéntica a BCGFII. Ahora esta molécula se conoce como IL-5 (Karlen *et al.*, 1998).

Mientras que la IL-5 se identificó inicialmente por su capacidad para apoyar el crecimiento y la diferenciación terminal de células B secretoras de anticuerpos de ratón *in vitro*, IL-5 recombinante ejerce actividades pleiotrópicas en diferentes células diana, incluyendo las células B, eosinófilos y basófilos. IL-5 es producido tanto por células hematopoyéticas y no hematopoyéticas incluyendo células T, granulocitos y células linfoides innatas. La expresión de IL-5 *in vivo* incrementa significativamente la producción de eosinófilos y células B, mientras que la pérdida del gen funcional de IL-5 o IL-5R muestra una serie de deficiencias en función y desarrollo de mencionadas células (Takatsu, 2011).

El receptor de IL-5 (IL-5R) consta de una sub unidad específica IL-5 α que interactúa con estructuras de la subunidad del receptor β c; esta subunidad comparte el sitio de unión con IL-3 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos. IL-5 y IL-5R llevan a respuestas inmunes alérgicas e inflamatorias, caracterizando numerosas enfermedades tales como asma, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades gastrointestinales eosinofílicas, síndrome de hipereosinofilia, síndrome de Churg-Strauss y la poliposis nasal eosinofílica (Molfino *et al.*, 2011).

2.10. IL-6

La IL-6 es una glicoproteína de 21 a 28 kDa y 184 aminoácidos. Posee una estructura helicoidal y comparte similitudes con otras citoquinas como IL-11, factor inhibidor de la leucemia, factor neurotrópico ciliar, oncostatina M, cardiotropina-1, IL-27, IL-31,

neurotropina-1/factor 3 estimulador de células B; juntas conforman la superfamilia de citoquinas de la IL-6 o familia de la gp130 (Nakashima y Taga, 1998).

IL-6 tiene muchas funciones y es producido por diferentes tipos celulares. IL6 es producido por una amplia variedad de células incluyendo macrófagos, linfocitos T, células epiteliales, hepatocitos, fibroblastos entre otros. Tiene un rol importante en la diferenciación terminal de células B a células plasmáticas, promueve la proliferación de células epiteliales, estimula la producción de las proteínas de la fase aguda por los hepatocitos y es factor diferenciador para los linfocitos T citotóxicos (Carrillo de Albornoz *et al.*, 2006). IL-6 es importante también para la diferenciación de células Th 17 junto con TFG- β *in vitro*, también induce la expresión de receptores para IL-21 e IL-23 promoviendo más la diferenciación hacia el perfil Th17 (Zhou *et al.*, 2007). IL-6 induce dominancia de células Th17 sobre las Treg e inhibe el desarrollo de estas últimas, esto explicaría la ruptura de la tolerancia inmune que se envuelve en el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Tanaka y Kishimoto, 2014).

Se han descrito dos vías de señalización diferentes para IL-6. En la vía de señalización clásica, IL-6 se une a IL-6R unido a membrana, conduciendo a la dimerización y activación de la proteína gp130. Gp130 se expresa en todas las células del cuerpo, sin embargo IL-6R sólo se expresa en algunas poblaciones de células, principalmente en los hepatocitos, neutrófilos, macrófagos y algunos linfocitos; por lo tanto, el efecto de la IL-6 a través de vía clásica se limita a las células mencionadas anteriormente. Existe también una vía alternativa, en esta vía IL-6 se une a un IL-6R soluble (sIL-6R) y este complejo IL-6 / sIL-6R activa gp130; en consecuencia, las células que carecen de IL-6R unido a membrana pueden responder a IL-6. Esta vía alternativa de IL-6 se llama trans-señalización (Drucker *et al.*, 2010).

La dimerización de gp130 lleva a la activación de proteínas JAK y la posterior fosforilación de residuos de tirosina dentro de la porción citoplasmática de gp130. Esto conduce a la participación de los dominios de homología Src fosfatasa que contienen tirosina fosfatasa-2 (SHP-2) y la activación de la vía ras / raf / proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Además, Las proteínas STAT 1 y 3 son reclutadas, fosforiladas y en consecuencia dimerizan para translocar al núcleo y activar los genes diana. Curiosamente sólo pocas células expresan el receptor IL-6R unida a la membrana, mientras que todas las células muestran gp130 en la superficie celular. Las células que sólo expresan

gp130 no responden a la IL-6 sola; estas células responden a un complejo de IL-6 unido a una forma soluble de origen natural del receptor de la IL-6 (Scheller *et al.*, 2011).

IL-6 controla las células B y la inmunidad humoral. IL-6 controla la supervivencia, expansión y maduración de las células B y células plasmáticas. La regulación del factor de transcripción Blimp-1 por STAT3 está vinculada a la secreción de anticuerpos y se asocia con células plasmáticas de larga vida que producen grandes cantidades de inmunoglobulina. IL-6 también controla la expresión de IL-21 en células T y la activación de STAT3, IL-21 aumenta la expresión de Bcl-6 y la generación de células T foliculares productoras de mencionadas citoquinas. Las actividades de Blimp-1 y Bcl-6 se contrarrestan entre sí, esta relación recíproca afecta tanto a la diferenciación y función de los linfocitos (Hunter y Jones, 2015). IL-6 es una citoquina clave para la diferenciación final de las células B activadas y para convertirse en células plasmáticas secretoras de Ig. Células B IgA + (sIgA +) del GALT, expresan altos niveles de receptor de IL-6 (IL-6R) y responden a IL-6 con aumentos significativos en el número de células secretoras de IgA. Cuando se examinó el efecto de la IL6 sobre la síntesis de anticuerpos IgA, las células productoras de IgA1 e IgA2 se incrementaron tras la incubación de células B del GALT con IL-6; sin embargo, el 60-70% de las células secretoras de IgA eran de la subclase IgA2 (Fujihashi., *et al* 1992).

2.11. IL-10

La IL-10 es una importante citoquina pleiotrópica inmunorreguladora secretada principalmente por los macrófagos, pero también por células T, células dendríticas, linfocitos B, monocitos y mastocitos. Algunos estudios han demostrado que se puede producir incluso por las líneas celulares de carcinoma humano (Gastl *et al.*, 1993). IL-10 inhibe la capacidad de los monocitos y macrófagos para presentar el antígeno a las células T a través de un efecto inhibitorio sobre la expresión del MHC II y de moléculas coestimuladoras como CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2); además, de una baja en la expresión de las citoquinas pro inflamatorias IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α . En las células B, IL-10 previene la apoptosis, mejora la proliferación celular y tiene un papel en el cambio de clase Ig (Trifunović *et al.*, 2015). Cabe resaltar que IL-10 es el miembro fundador de la llamada familia IL-10 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 y IL-26) (Volk *et al.*, 2001).

IL-10 ejerce sus efectos mediante la unión a su receptor IL-10R, un tetrámero compuesto por dos cadenas distintas (IL-10R1 e IL-10R2). IL-10R1 se une específicamente a IL-10, lo que permite la oligomerización con IL-10R2. IL-10R2 es ampliamente expresado, mientras que IL-10R1 se limita a leucocitos y órganos linfoides con niveles altos en los monocitos y macrófagos; también se expresa en células NK, células T CD4 + y T CD8+, DC, células B y las células cebadas. Por lo tanto, los efectos de la IL-10 parecen estar restringido a células diferenciadas del sistema inmune (Hutchins *et al.*, 2013).

La vía de señalización de la IL-10 es regulado por el sistema JAK / STAT. La interacción IL-10/IL-10R involucra las tirosina quinasas Jak1, Jak2 y Tyk2, que están constitutivamente asociadas con IL-10R1 e IL-10R2. IL-10 induce la fosforilación de tirosina y la activación de los factores de transcripción STAT3, STAT1 y en células no macrófagos STAT5 (Moore *et al.*, 2001).

En las células T helper, la expresión de IL-10 está acompañada por la expresión de las citoquinas firma de cada subconjunto, además de necesitarse los mismo factores de transcripción para la diferenciación a los distintos linajes. Células Th1 producen IL-10 a través de una fuerte señalización del TCR (altas dosis de antígeno), la presencia de IL-12 y la expresión de STAT4, alcanzando los niveles máximos de expresión de IL-10 al ser reestimulados. En las células Th2, las vías de señalización de IL-4, STAT6 y GATA3 son requeridas para la expresión de IL-10. En las células Th17 se necesita de la activación de STAT 3 y en algunos casos STAT 1. Demostrando que la expresión de IL-10 necesita las mismas señales que necesita cada perfil de células T helper para su diferenciación (Saraiva y O'Garra, 2010).

La expresión de GATA3 en células T CD4+ vírgenes incrementa la expresión de IL-10 por estas células. GATA3 induce cambios de la estructura de la cromatina en el locus *Il 10* y estos cambios se producen incluso en ausencia de IL-4. Además, en presencia de GATA3 se produce la acetilación de las histonas en el locus *Il-10*. Por lo tanto, GATA3 tiene un papel clave para la expresión génica de IL-10 en células TCD4+ primarias (Shoemaker *et al.*, 2006). La reestimulación de una célula Th2 de memoria en presencia de IL-4 estimula la acetilación extensa de histonas del gen de IL-10; esta impronta epigenética se

correlaciona con el desarrollo de una memoria para IL-10 en células Th2 reestimuladas repetidamente (Chang *et al.*, 2007).

2.12. TGF- β

El Factor de crecimiento transformante β (TGF- β) llamo la atención en 1981 como unos 25 kD de actividad biológica capaz de inducir el crecimiento de fibroblastos de roedores en agar blando y en presencia de un cofactor, el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Dos años más tarde, TGF- β se purificó a homogeneidad a partir de tres fuentes: plaquetas humanas, placenta humana y de riñón bovino. En 1984 se demostró que TGF- β podía inhibir el crecimiento de una célula epitelial. A finales de esa década se había establecido que las tres isoformas de TGF- β de mamíferos eran un subconjunto de una familia mucho más grande de moléculas implicadas en el crecimiento y el desarrollo, siendo TGF- β 1, β 2 y β 3 72-79% similares en la secuencia de las formas activas. Estas 3 isoformas exhibieron diferencias espaciales y temporales en su expresión, siendo inhibidoras del crecimiento y ejerciendo efectos pro-fibróticos y antiinflamatorios en la mayoría de células (Lawrence, 2001).

La superfamilia de TGF- β se compone de un gran grupo de proteínas, incluyendo las proteínas activina / inhibina, familia morfogenética ósea (BMP), factores de diferenciación de crecimiento (GDF), la subfamilia TGF- β , y el factor neurotrófico derivado de línea celular glial (GDNF). Los miembros de la superfamilia TGF- β regulan diferentes funciones celulares como proliferación, apoptosis, diferenciación, migración, y tienen un papel clave en el desarrollo del organismo.

Existen tres isoformas conocidas (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3). Estas isoformas se expresan en tejidos de mamíferos que contienen regiones altamente conservadas pero divergen en varias regiones de aminoácidos. TGF- β 1 es la más abundante; TGF- β 2 es expresado por neuronas y las células gliales en el sistema nervioso embrionario, siendo importante en el crecimiento tumoral, aumento de la proliferación celular e inhibe la expresión de IL-2; TGF- β 3 tiene funciones en el desarrollo normal del paladar y morfogénesis de pulmón. TGF- β 1 y TGF- β 2 comparten 71% de similitud en secuencias de aminoácidos mientras que un 80% con TGF- β 3. Cabe resaltar que las 3 isoformas

funcionan a través de las mismas vías de señalización del receptor (Kubiczkova *et al.*, 2012).

La señalización de TGF- β se inicia por la unión de TGF- β a sus receptores de membrana de tipo II (TGF β -RII) y tipo I (TGF β -RI). La unión del ligando conduce a la formación de un heterocomplejo en el receptor, en el que T β RII fosforila residuos de treonina y serina en el motivo TTSGSGSG de T β RI para activarlo. EL T β R I activado recluta y fosforila las proteínas Smad 2 y 3 para la señalización de TGF- β y activina mientras Smad1/ 5/8 para la señalización de BMP (bone morphogenetic proteins), que luego forman una heterocomplejo con el Co- Smad4. Los complejos Smad son translocados hacia el núcleo para regular la transcripción de los genes diana en cooperación con otros co-factores (Huang y Chen, 2012).

TGF- β tiene múltiples funciones en procesos inmunes. Suprime el crecimiento y diferenciación de muchos linajes de células inmunes, incluyendo células T y B. Regula la expresión de moléculas de adhesión, especialmente en la médula ósea y en el microambiente tímico. Es un quimio atrayente para fibroblastos, monocitos y neutrófilos e inhibe la activación del sistema inmune por presentación antigénica o de interleucinas. *In vivo* inhibe la secreción de IgG e IgM y suprime la hematopoyesis dependiente de IL-3. De manera importante y relevante, TGF- β también regula la proliferación y maduración en células B y tiene un papel regulatorio crítico en la expresión de IgA (Gálvez *et al.*, 2004).

En la mucosa intestinal TGF- β tiene un rol pluripotencial. TGF- β impulsa el desarrollo de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Tregs), células Th17, células B IgA⁺ y linfocitos intraepiteliales TCR $\alpha\beta$ + CD8 $\alpha\alpha$ + que actúan para promover la integridad de la barrera intestinal. La generación de Treg Foxp3⁺ en la mucosa del intestino es apoyado por altas concentraciones de TGF- β . Generación de Treg también se ve favorecido por las células dendríticas CD103⁺ que promueven el desarrollo tanto de células T reguladoras y células B IgA⁺ a través de TGF- β y ácido retinoico. La microbioma también puede influir en la generación de Treg, *Clostridium* spp muestra aumento de la población Treg en el intestino. Las células Tregs puede a su vez promover el desarrollo de células B IgA⁺ dependiente de TGF- β y es posible que mejoren la diferenciación de las células Th17. La generación de células Th17 depende de citoquinas inflamatorias como la IL-6 que actúan junto con TGF- β para su diferenciación y acción efectora (Konkel y Chen., 2011).

TGF- β inhibe la diferenciación de células TCD4+ vírgenes a células Th1 y Th2. TGF- β bloquea la diferenciación a células Th1 reduciendo la expresión del receptor IL-12R β 2 y la expresión de Tbet. También inhibe la diferenciación de células Th2 a través de la supresión de GATA3 e IL-4 mediado por STAT6. Esto sugiere que el rol de TGF- β en la diferenciación de células Th17 se debe a la supresión de IFN- γ e IL-4, citoquinas que inhiben fuertemente la diferenciación de Th17. Esto se basa en un informe donde muestra que la IL-6 sola era suficiente para inducir la diferenciación de las células Th17 en ratones STAT6 (- / -) T-bet (- / -), que son incapaces de generar células Th1 y Th2 (Das *et al.* 2009). Sin embargo, TGF- β no afecta la producción de citoquinas de células Th1 y Th2 totalmente diferenciadas (Ludviksson *et al.* 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

Los animales fueron obtenidos de la estación experimental de IVITA, en el Departamento de cusco, provincia de Canchis, distrito de Marangani; entre los meses de enero y marzo del 2014, siendo época de parición de las alpacas. Cabe resaltar que entre los meses de enero a abril son temporadas altas de lluvias, propiciando mejores pastos para la alimentación de las alpacas pero a la vez mayor proliferación microbiológica.

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2. Animales y muestra

Se establecieron 3 grupos etarios, cada uno estuvo constituido por 6 crías de alpaca (Cuadro 1) sin tomar en cuenta raza, sexo y que no hayan manifestado signos de enfermedad.

Los animales en estudio tuvieron una crianza semiextensiva, basándose en una alimentación netamente de pastoreo y viviendo en la intemperie, sin embargo, estos animales tienen algunos controles sanitarios como desparasitaciones (albendazol o ivermectina) y aplicación de vacuna contra la enterotoxemia. El manejo reproductivo de los animales consiste en empadres controlados y separación de las madres junto con sus crías en grupos de fecha de natalidad cercana, alejadas de los machos y alpacas de otras edades.

Cuadro 1. Características de los grupos etarios asignados en el estudio.

GRUPO ETARIO	NUMERO DE INDIVIDUOS	CARACTERISTICAS
Animales calibradores	3	Feto de 11 meses de gestación
Grupo 1	6	Animales de 2 a 8 días de edad
Grupo 2	6	Animales de 10 a 21 días de edad
Grupo 3	6	Animales de 26 a 47 días de edad

Los calibradores (n=3) corresponden a fetos al término de gestación que están exentos de los componentes transferidos a través de la inmunidad pasiva por lo que no están influenciados por estos factores mencionados ni por factores externos.

La designación de los grupos etarios se basó en trabajos anteriores, donde se evaluó la expresión de citoquinas en alpacas clínicamente sanas de 1 a 6 semanas de vida (Bardález *et al*, 2013; Chiok, 2012; Herrera, 2012; More *et al*, 2011), mostrando un notable aumento de la expresión en animales de aproximadamente 2 a 8 días de edad y un mayor aumento en animales de 10 a 21 días de edad aproximadamente. En animales de aproximadamente 30 a 40 días de edad se encuentra un descenso de la expresión en algunas citoquinas o un mayor aumento de la expresión en otras citoquinas. Además cada grupo etario coincide con la aparición de determinados patógenos, teniendo conocimiento que en las primeras semanas de vida de la alpaca se ven afectadas por la presencia de *Cryptosporidium* spp (Palacios, 2008; Villacorta *et al.*, 2009), *Giardia* spp (Gómez-Couso *et al.*, 2012; Gomez-Puerta *et al.*, 2014), *Rotavirus*, *Betacoronavirus* (Luna *et al.*, 2015) y en animales de 30 días a más presentan alta prevalencia de *Eimeria* spp (Rodríguez *et al.*, 2012).

Dado que no existen referencias acerca del uso de fármacos para la eutanasia en alpacas, se empleó la metodología descrita por Swindle (1998). Se empleó una combinación de Ketamina (20 mg/Kg IM) y clorhidrato de Xylacina (2 mg/Kg IM) para conseguir la anestesia general del animal. Finalmente, se aplicó una sobredosis de pentobarbital sódico (70 mg/Kg IV) produciendo en el animal un paro cardio-respiratorio. Se comprobó los signos vitales para confirmar el deceso de los animales y proceder con la necropsia y toma

de muestras que se realizaron en el laboratorio de patología del centro de investigación del IVITA Marangani.

3.3. Toma de muestra

Se tomó una porción transversal de 2cm de longitud del yeyuno, este segmento se utilizó para la técnica RT-PCR y se tomó otros 2 cm adicionales del yeyuno para el análisis histopatológico. Estos segmentos se obtuvieron en el laboratorio del centro de investigación del IVITA Marangani utilizando vestimenta y material quirúrgico estéril. Los segmentos fueron lavados con suero fisiológico al 0.9% para eliminar restos de contenido intestinal potencialmente inhibidores de la técnica RT-PCR tiempo real e inmediatamente después se colocaron en crioviales estériles de 2ml de capacidad previamente rotulados y congelados en nitrógeno líquido (-196°C) para su futuro transporte hacia el laboratorio. Para el análisis histopatológico, las muestras tomadas se fijaron en formaldehído tamponado al 10% para su empleo en la elaboración de láminas histológicas teñidas con Hematoxilina – Eosina (HE).

3.4. Extracción de ARN total

Una vez llegadas las muestras al laboratorio de Parasitología Microbiología de la facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, fueron retiradas del tanque de nitrógenos líquido. Las muestras fueron cortadas y pesadas dentro de un rango de 100 a 150 mg. Se trituraron en mortero y pilón estériles conservándose a -20°C en todo el proceso con la constante adición de nitrógeno líquido. Se adicionó 2 ml de TRIzol[®] (Invitrogen, USA) y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se adicionó 200 µl de cloroformo a 4°C para luego ser centrifugado a 12000 g por 15 minutos a 4°C, observando la separación de 3 fases y tomando la fase superior acuosa de la mezcla el cual contiene el ARN total extraído. Se tomó 350 µl de la fase acuosa y se agregó 350 µl de etanol al 70% a 4°C. Posteriormente se transfirió a tubos con membranas de sílica, siguiendo las instrucciones del Kit PureLink[™] Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, USA). El ARN obtenido se cuantificó usando el kit Quant – it[™] (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando el fluorómetro Qubit[™] (Invitrogen, USA). Una vez cuantificado se procedió a realizar diluciones en agua libre de nucleasas para trabajar con 1µg en un volumen en 2µl por muestra y usarla en el RT-PCR tiempo real.

El ARN obtenido en el procedimiento anterior se tomó como templado para la síntesis de ADNc (ADN complementario) para cada una de las muestras, empleando el kit “Super Script™ III First-Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR” (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Adicionalmente, la habitación y materiales como pipetas, gradillas y demás materiales plásticos no perecibles se irradiaron con luz ultravioleta por un tiempo mínimo de 12 horas previas a su uso. Se realizó una premezcla con los reactivos del kit “Super Script™ III” en tubos eppendorf de 2 ml de capacidad, nuevos y libres de nucleasas previo tratamiento de autoclavado por 3 veces. Esta premezcla se realizó teniendo en cuenta el número de muestras y volumen final de la reacción y se mantuvieron en hielo durante su preparación. En la premezcla no se incluye el ARN.

- 2x RT Reaction mix 5 µl x n*
- RT enzyme mix 1 µl x n
- H2O 2 µl x n
- ARN 2µl
- TOTAL 10µl

n= número de muestras a trabajar

Una vez realizada la premezcla se procede a distribuir 8µl en cada tubo descartable para termociclador de 200µl de capacidad. Posteriormente, se procedió a distribuir los 2 µl de ARN templado (conteniendo 1ug de ARN total) en cada uno de los tubos correspondientes. Las muestras se llevaron al termociclador Applied Biosystem® 7500 programado con el siguiente protocolo: 1 ciclo de 25° C por 10 minutos, 50° C por 30 minutos, 85° C por 5 minutos.

Terminado este protocolo se añadió 2 UI de RNasa H+ de *E.coli* (proveído por el kit) a cada pocillo y se incubó a 37° C por 20 minutos para destruir la molécula de ARN del híbrido ARN-ADNc. El ADNc obtenido fue congelado a -70° C hasta su uso en la reacción de PCR Tiempo Real.

3.5. PCR Tiempo Real

Para la realización de la técnica PCR Tiempo real se utilizaron los siguientes cebadores:

Cuadro 2. Cebadores empleados para la técnica RT-PCR Tiempo real

Gen	Producto		Secuencia (5'-3')	Acceso Genbank	Tm
GAPDH	201	F	ATCACTGCCACCCAGAAGAC	XM_006210852.1	60.12
		R	GCACGTCAGATCCACAACAG		60.32
IL-4	195	F	TCATCAAAACGCTGAACACC	XM_006212827.1	59.70
		R	CGCTGAGGTTCTCTGTCAAGT		60.44
IL-5	200	F	GATAGGCGA Y GGGAACTTGA	XM_006212831.1	60.04
		R	GCCATCTT Y CTCCTCCACAC		59.66
IL-6	197	F	CCTGGTGATGGCTACTGCTT	XM_006201793.1	60.28
		R	ACAGTGCCTCCTTGCTGTTT		59.91
IL-10	205	F	TTACCTGGAGGAGGTGATGC	XM_006215461.1	60.07
		R	GGCTTTGTAGACCCCTTCT		59.58
TGF- β :	185	F	GAGGTGATCT Y GCCACCATT	NM_001290071.1	59.93
		R	GTCCTTGCGGAAGTCAATGT		60.12
GATA3	201	F	AGGCAGGGAGTGTGTGAACT	XM_006213126.1	59.76
		R	GTCGTGGTTGTGGTTTGACA		60.46

Para obtener los cebadores de todos los genes se utilizó el programa Primer3 y Primer Blast del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) a partir de secuencias publicadas en el banco de genes (GenBank) indicado en el cuadro 2.

Una vez obtenido los cebadores, fueron diluidos en agua libre de nucleasas logrando soluciones de trabajo de 10 μ M; en base a esto, la concentración final en la reacción fue de 0.2 μ M en todos los casos. Cabe resaltar, que los instrumentos de laboratorio fueron nuevos y libre de nucleasas; Además, los ambientes e instrumentos previamente mencionados fueron irradiados con luz ultravioleta anterior a su utilización.

Para la realización del PCR tiempo Real se utilizó el kit SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal y el termociclador Applied Biosystem® 7500 real-time PCR system.

El ADNc obtenido en la transcripción inversa se empleó como templado para la reacción de PCR. Luego se procedió a preparar el master mix mezclando los componentes del kit en un tubo eppendorf de 2 ml de capacidad sin incluir el ADNc, siguiendo orden y volumen mostrado a continuación:

• SybrGreen Master Mix	12.5 µl
• Forward Primer	0.5 µl
• Reverse Primer	0.5 µl
• ROX (1:10)	0.5 µl
• H2O	9.0 µl
• ADNc	2 µl
• TOTAL	25 µl

Después de haber distribuido 23 µl de master mix en los tubos de PCR blanco correspondientes, se procedió a adicionar 2 µl de ADNc (conteniendo 20ng de ADNc) en sus respectivos tubos.

El ADNc usado como templado deriva del ARN obtenido en el proceso de extracción, posteriormente diluido para trabajar con una concentración de 1ug de ARN. El ADNc usado para la técnica PCR tiempo real fue diluido en 1:5 para obtener una concentración de 10ng/µl con la finalidad de maximizar el uso de material genético extraído sin afectar la eficiencia de la técnica. En total se usó 20 ng de ADNc por reacción de PCR tiempo real.

Finalizando las mezclas, los tubos se introdujeron en el termociclador y se aplicó el siguiente protocolo usando el software 7500 software v2.0.1:

- 50°C por 2 minutos (Incubación con UDG)
- 95° C por 10 minutos (Inactivación UDG y activación de DNA polimerasa)
- 45 ciclos:
 - 95° C por 15 segundos
 - 60° C por 60 segundos

- Temperatura de melting: de 65-87°C, cada 0.3°C por 2 segundos con lectura de placa.
- Mantener a 10° C.

Los productos obtenidos en la técnica PCR fueron leídos usando el software 7500 v2.0.1 en el que muestra la curva de amplificación o ciclo umbral (Ct) y una curva de disociación (Tm), demostrando la especificidad de los productos amplificados.

3.6. Análisis de la expresión de genes

Se empleó la técnica $2^{-\Delta\Delta Ct}$ como técnica de cuantificación de la expresión relativa de genes detectables a través de RT-PCR Tiempo Real (Livak y Schmittgen, 2001). El método se basa en el análisis comparativo de los ciclos treshold (Ct) de las muestras a estudiar con los Ct del calibrador (fetos de alpaca de 11 meses de gestación); tanto el Ct de las muestras como el del calibrador se compara con el Ct de un control endógeno. Como gen endógeno para la normalización de la cuantificación relativa se utilizó el gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Donde:

$$N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

N = Cantidad relativa de ARNm con respecto al calibrador

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{muestra}) - \Delta Ct (\text{calibrador})$$

$$\Delta Ct (\text{muestra}) = Ct \text{ gen de citoquina interés (muestra)} - Ct \text{ control endógeno (muestra)}$$

$$\Delta Ct (\text{calibrador}) = ct \text{ gen de citoquina interés (calibrador)} - ct \text{ control endógeno (calibrador)}.$$

En este método los resultados son presentados como cantidades en número de veces con respecto a un calibrador (fetos de alpaca de 11 meses de gestación). Los resultados se interpretan como el gen de la citoquina en estudio se ha expresado “X” veces como el gen del calibrador. X = Valor numérico resultado del método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.7. Análisis histopatológico

Se realizó un análisis histopatológico para determinar el estado histológico de las muestras debido a la posible existencia de alteraciones subclínicas en la mucosa intestinal propio de la constante interacción entre microorganismos saprófitos y potencialmente patógenos, para lo cual se utilizó 18 muestras de alpacas clínicamente sanas pertenecientes de los grupos etarios 1, 2 y 3. Se tomó en cada individuo aproximadamente 2 cm de longitud de la porción media del yeyuno. Esta porción fue embebida en formaldehído tamponado al 10%. Las muestras se procesaron según protocolos estándares para estudios histológicos con la tinción Hematoxilina- Eosina.

3.8. Análisis estadístico

Se analizó la expresión de ARNm a través de la cuantificación relativa de cada una de las citoquinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β y el factor transcripcional GATA3 en cada uno de los distintos grupos etarios (grupo 1, 2 y 3) en crías de alpacas. Se usó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si las variables siguen la distribución normal. En las variables que siguieron la distribución normal se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de un factor para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa en al menos uno de los grupos etarios. Para determinar en qué grupos etarios existe diferencia estadística significativa se usó la prueba Post hoc de Bonferroni. Para las variables que no siguen la distribución normal se usó la prueba de Kruskal – Wallis, así determinar si existe diferencia estadísticamente significativa en al menos uno de los grupos etarios. Para determinar en qué grupos etarios existe diferencia estadística significativa se comparó los diferentes grupos usando la prueba U de Mann-Whitney multiplicando el “valor p” por el número de comparaciones (Martínez-Gonzales *et al*, 2006). Los datos se procesaron mediante el software estadístico STATA versión 11.0 estableciendo la significación estadística de 0.05.

IV. RESULTADOS

4.1. Expresión de GAPDH

Se analizó la expresión del gen GAPDH (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa) usado como control interno o endógeno demostrando que todas las muestras obtenidas expresaron este gen. Los valores Ct (Ciclo Threshold o Ciclo umbral) variaron dentro de un rango de 19.3 a 23.8 (Figura 2). Los valores de Tm (Temperatura de melting o disociación) tuvieron un rango de 86 a 86.5°C (Figura 3), demostrando la amplificación de un producto único y específico.

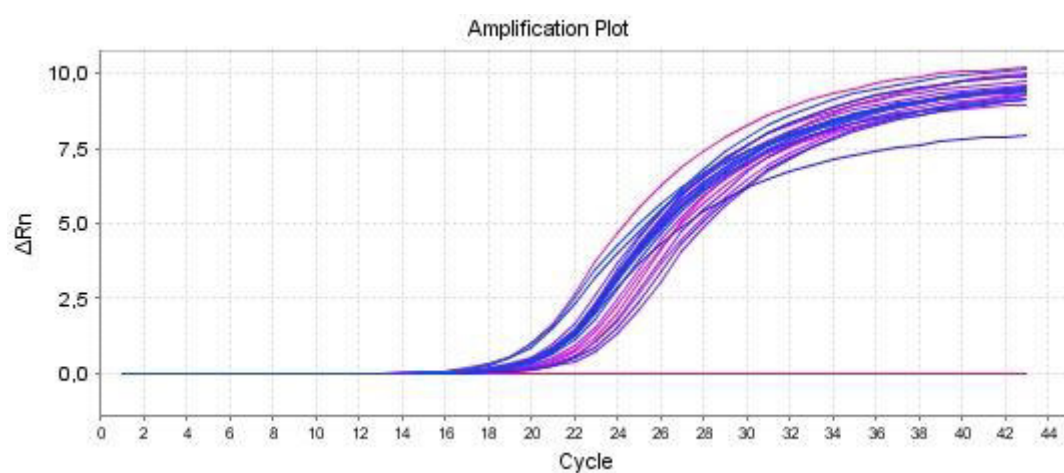


Figura 2. Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para GAPDH en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas. Los productos tuvieron un Ct entre 19.3 y 23.8

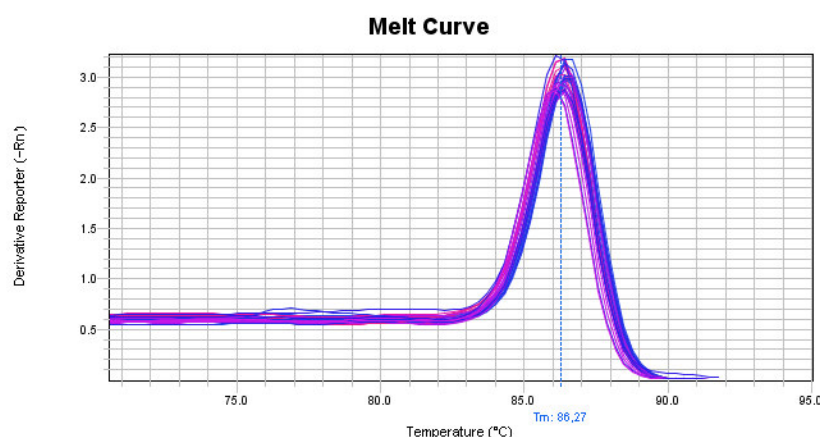


Figura 3. Curvas de disociación (Tm) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen GAPDH en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Los valores Tm oscilaron entre 86°C a 86.5°C

4.2. Expresión de IL-4

Se observa una expresión ascendente del gen de IL-4 en las primeras semanas de vida, alcanzando un pico máximo en los animales del grupo 2 para luego disminuir ligeramente en los animales del grupo 3. Los valores Ct variaron dentro de un rango de 32.2 hasta 36.9 (Figura 4). Los productos amplificados tuvieron valores de Tm que oscilaron entre los 82.3 a 83.0 °C (Figura 5) demostrando la amplificación de un producto único y específico. Solo un animal de 14 días no tuvo niveles detectables de ARNm de este gen.

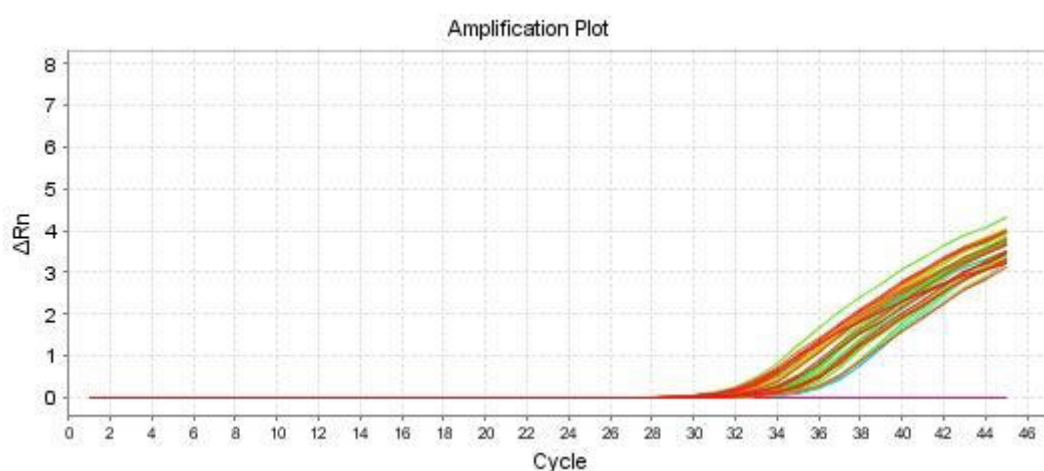


Figura 4. Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para IL-4 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas. Los productos tuvieron un Ct entre 32.2 y 36.9

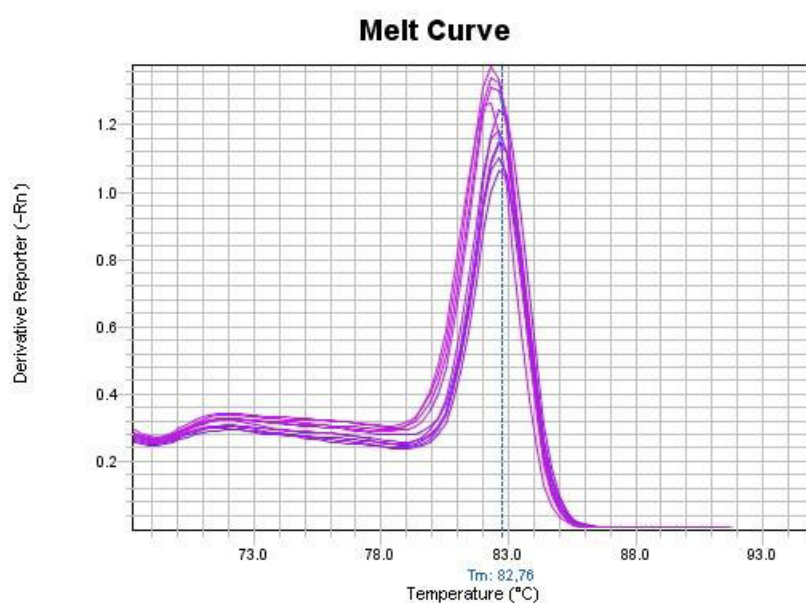


Figura 5. Curvas de disociación (Tm) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen de IL-4 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Los valores de Tm oscilaron entre 82.3 a 83.0 °C

La cuantificación relativa de la expresión del gen de IL-4 mostró que los animales del grupo 1, 2 y 3 respectivamente expresaron 2.48 ± 0.26 , 8.59 ± 0.30 y 6.58 ± 0.48 veces este gen con respecto al grupo calibrador (Figura 6). La prueba de Kruskal - Wallis concluye que existe diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en al menos uno de los grupos etarios. La comparación múltiple usando la prueba de U Mann - Whitney señala que existe diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos etarios.

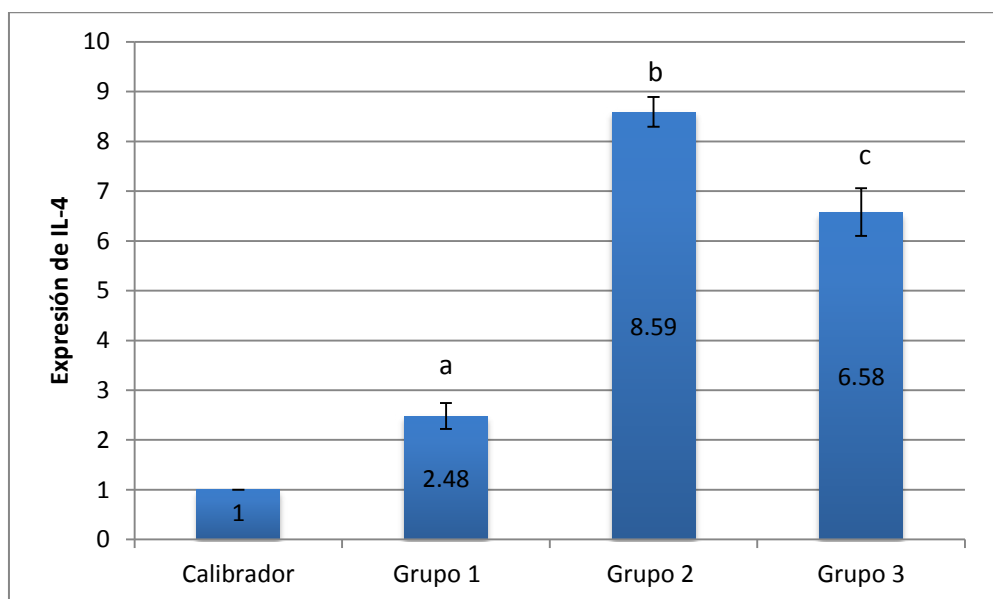


Figura 6. Niveles de expresión de IL-4 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar de la expresión de los grupos etarios evaluados. ^{a,b,c} Letras diferentes sobre las columnas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

4.3. Expresión de IL-5

Se observa una expresión del gen con el mismo comportamiento de IL-4 siendo estos valores inferiores. La expresión del gen aumenta de manera gradual hasta alcanzar su valor máximo en los animales del grupo 2, para luego disminuir ligeramente en los animales del grupo 3. Los valores Ct variaron dentro de un rango de 30.5 hasta 34.1 (Figura 7). Los productos amplificados tuvieron valores de Tm que oscilaron entre los 74.9 a 75.4 ° C (Figura 8) demostrando la amplificación de un producto único y específico. Todos los animales presentaron niveles detectables de ARNm de este gen.

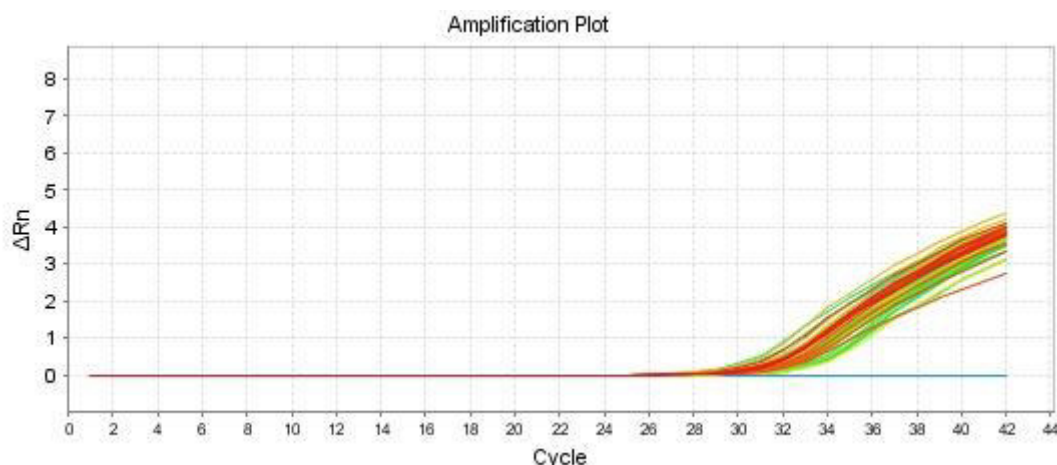


Figura 7. Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas. Los productos tuvieron un Ct entre 30.5 y 34.1

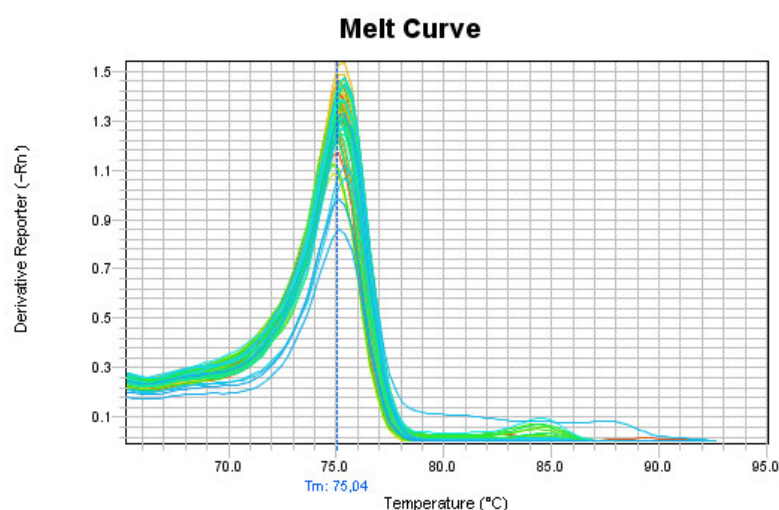


Figura 8. Curvas de disociación (Tm) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen de IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Los valores de Tm oscilaron entre 74.9 a 75.4 °C

La cuantificación relativa de la expresión del gen de IL-5 mostró que los animales del grupo 1,2 y 3 respectivamente expresaron 2.15 ± 0.13 , 2.65 ± 0.11 y 2.44 ± 0.10 veces este gen con respecto al grupo calibrador (Figura 9). La prueba de ANOVA de una vía concluye que existe diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en al menos uno de los grupos etarios. La prueba de Bonferroni señala que existe diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos etarios.

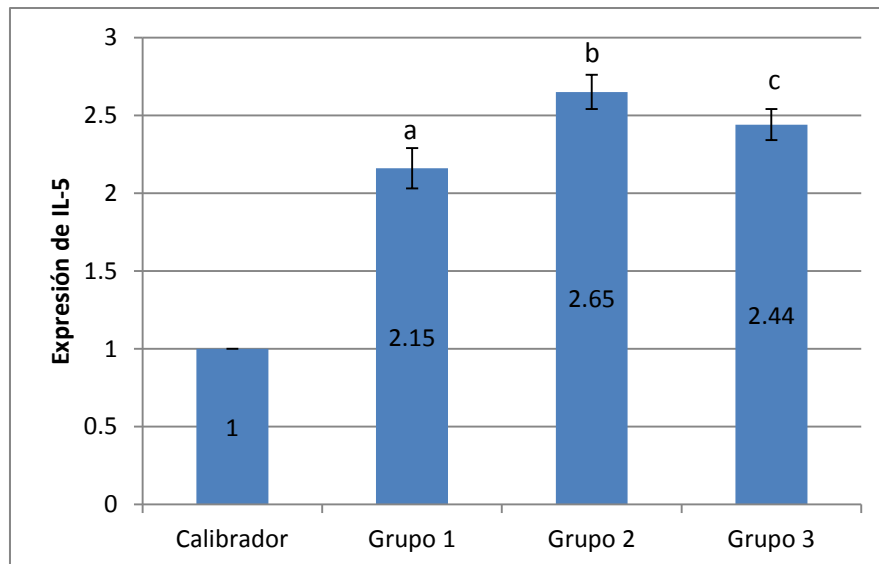


Figura 9. Niveles de expresión de IL-5 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar de la expresión de los grupos etarios evaluados. ^{a,b,c} Letras diferentes sobre las columnas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

4.4. Expresión de IL-6

La expresión del gen de IL-6 manifiesta un patrón de crecimiento progresivo al aumentar la edad, alcanzado la mayor expresión en los animales del grupo 3. Los valores Ct variaron dentro de un rango de 27.4 hasta 32.0 (Figura 10). Los productos amplificados tuvieron valores de Tm que oscilaron entre los 78.5 a 79.0 ° C (Figura 11) demostrando la amplificación de un producto único y específico. Todos los animales presentaron niveles detectables de ARNm de este gen.

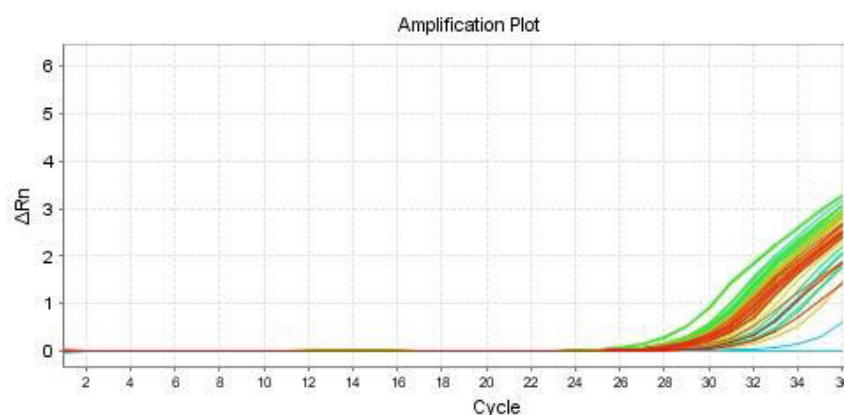


Figura 10. Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas. Los productos tuvieron un Ct entre 27.4 y 32.0

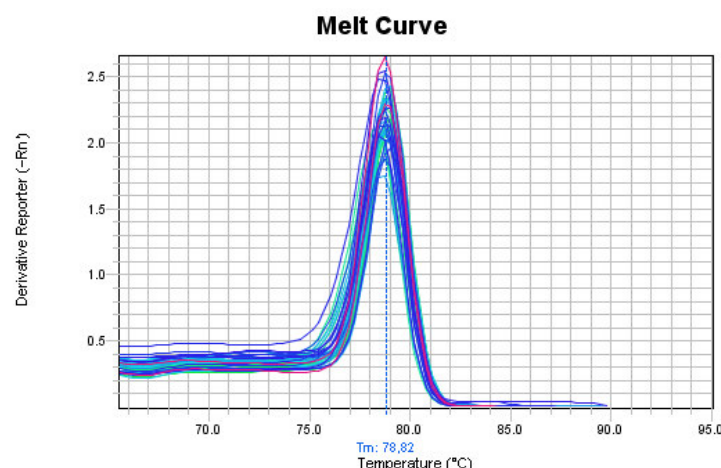


Figura 11. Curvas de disociación (T_m) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Los valores de T_m oscilaron entre 78.5 a 79.0 °C

La cuantificación relativa de la expresión del gen de IL-6 mostró que los animales del grupo 1, 2 y 3 respectivamente expresaron 5.04 ± 1.06 , 8.00 ± 1.10 y 10.60 ± 1.29 veces este gen con respecto al grupo calibrador (Figura 12). La prueba de ANOVA de una vía concluye que existe diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en al menos uno de los grupos etarios. La prueba de Bonferroni señala que existe diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos etarios.

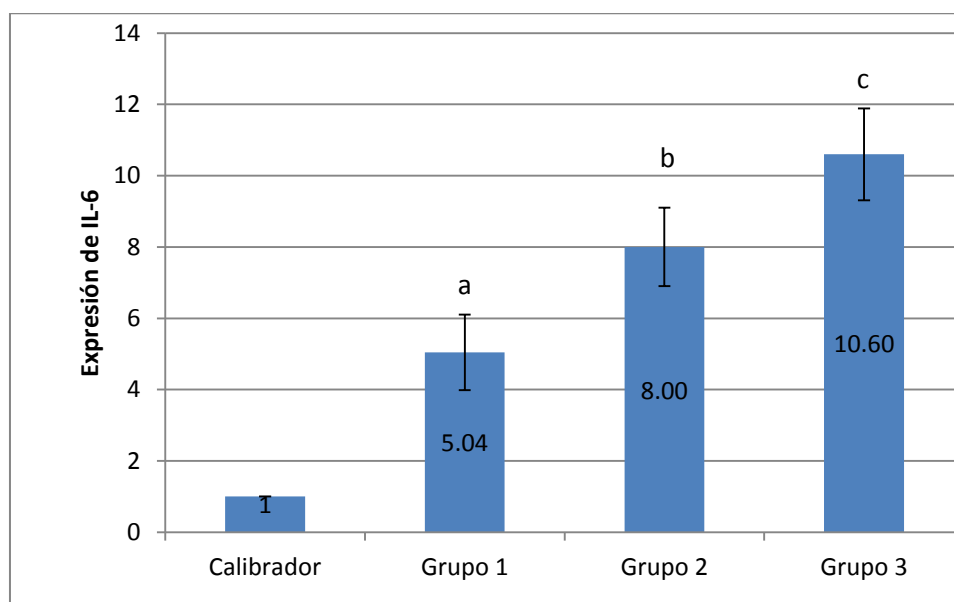


Figura 12. Niveles de expresión de IL-6 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar de la expresión de los grupos etarios evaluados ^{a,b,c} Letras diferentes sobre las columnas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

4.5. Expresión de IL-10

La expresión del gen de IL-10 manifiesta un patrón de crecimiento progresivo al aumentar la edad, logrando alcanzar la máxima expresión en los animales del grupo 3. Los valores Ct variaron dentro de un rango de 22.7 hasta 26.8 (Figura 13). Los productos amplificados tuvieron valores de Tm que oscilaron entre los 83.1 a 83.8 °C (Figura 14) demostrando la amplificación de un producto único y específico. Todos los animales presentaron niveles detectables de ARNm de este gen.

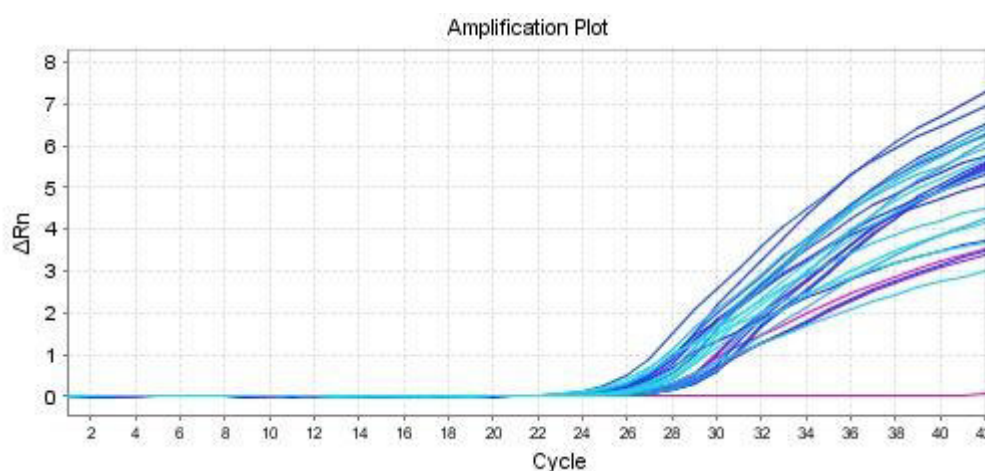


Figura 13. Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para IL-10 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas. Los productos tuvieron un Ct entre 22.7 y 26.8

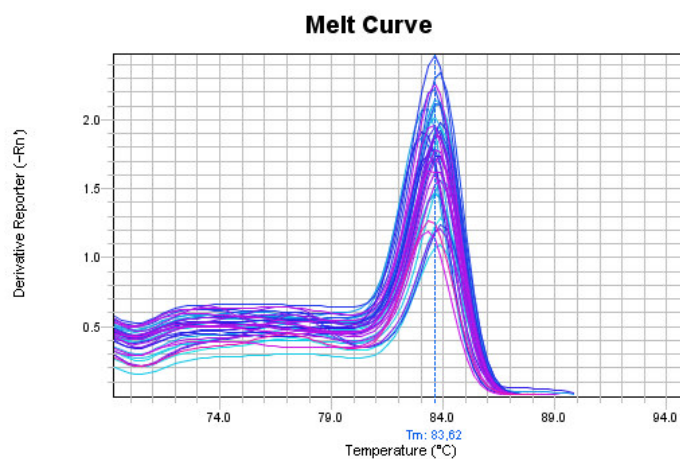


Figura 14. Curvas de disociación (Tm) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen IL-10 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Los valores de Tm oscilaron entre 83.1.a 83.8 °C

La cuantificación relativa de la expresión del gen de IL-10 mostró que los animales del grupo 1, 2 y 3 respectivamente expresaron 7.21 ± 1.02 , 13.53 ± 1.26 , 18.77 ± 1.48 veces este gen con respecto al grupo calibrador (Figura 15). La prueba de ANOVA de una vía concluye que existe diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en al menos uno de los grupos etarios. La prueba de Bonferroni señala que existe diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos etarios.

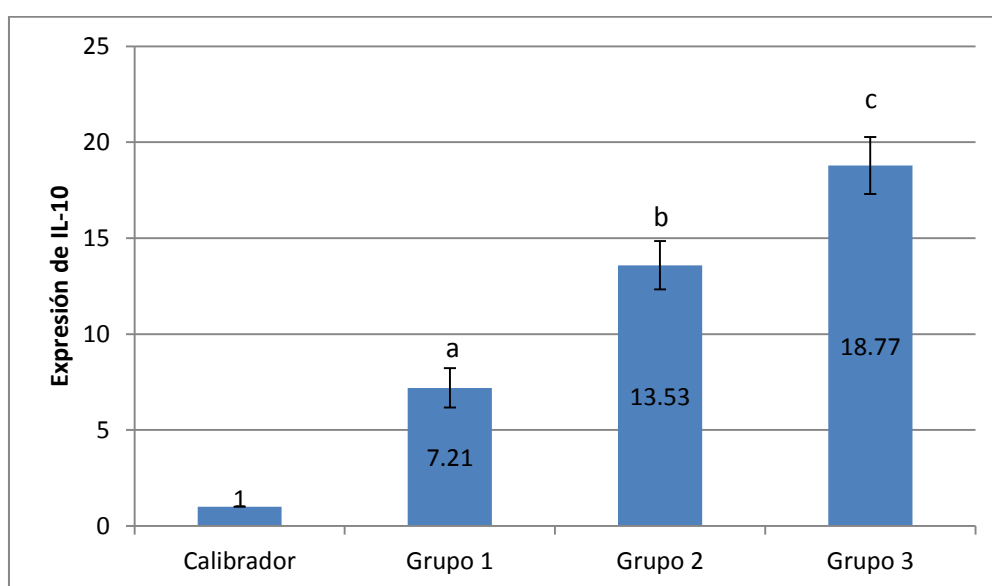


Figura 15. Niveles de expresión de IL-10 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar de la expresión de los grupos etarios evaluados. ^{a,b,c} Letras diferentes sobre las columnas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

4.6. Expresión de TGF- β

La expresión del gen de TGF- β manifiesta un patrón de crecimiento progresivo al aumentar la edad, logrando alcanzar la máxima expresión en los animales del grupo 3. Los valores Ct variación dentro de un rango de 24.5 hasta 27.9. Los productos amplificados tuvieron valores de Tm que oscilaron entre los 84.8 a 85.4° C demostrando la amplificación de un producto único y específico. Todos los animales presentaron niveles detectables de ARNm de este gen.

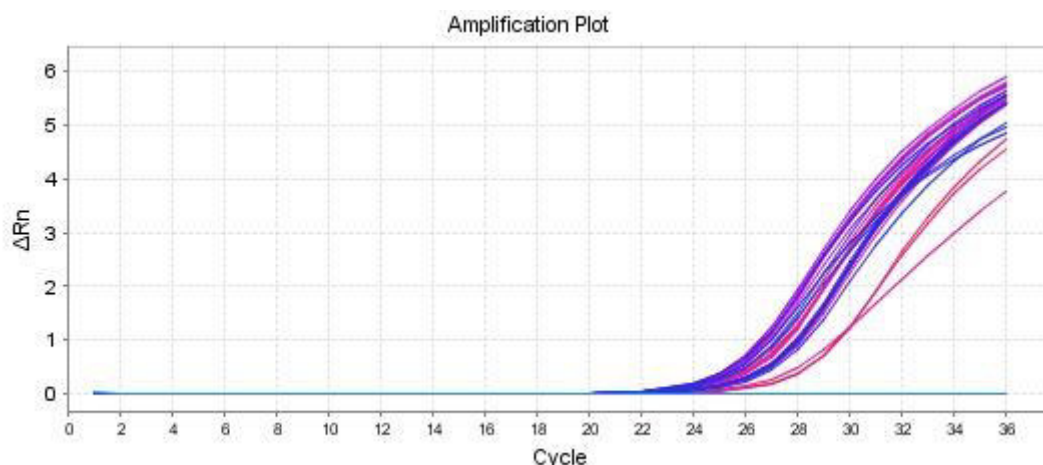


Figura 16. Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para TGF- β en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas. Los productos tuvieron un Ct entre 24.5 y 27.9

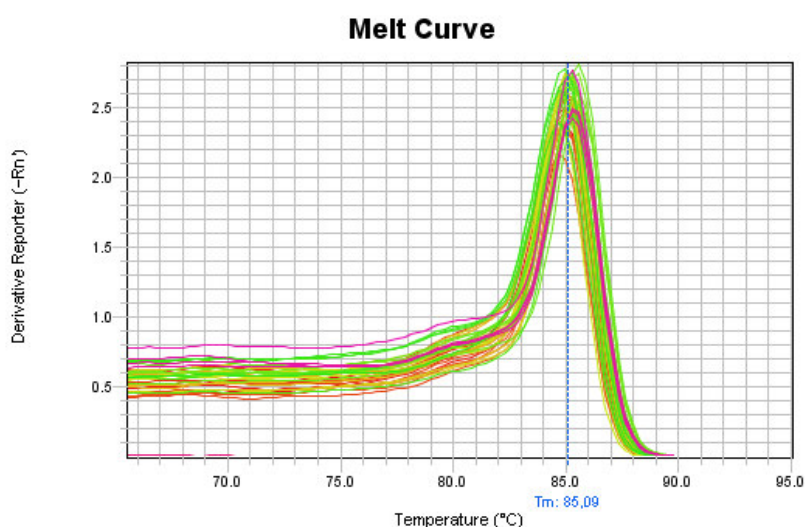


Figura 17. Curvas de disociación (Tm) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen TGF- β en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Los valores de Tm oscilaron entre 84.8°C a 85.4° C

La cuantificación relativa de la expresión del gen de TGF- β mostró que los animales del grupo 1, 2 y 3 respectivamente expresaron 2.18 ± 0.23 , 3.03 ± 0.18 y 4.06 ± 0.15 veces este gen con respecto al grupo calibrador (Figura 18). La prueba de ANOVA de una vía concluye que existe diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en al menos uno de los grupos etarios. La prueba de Bonferroni señala que existe diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos etarios.

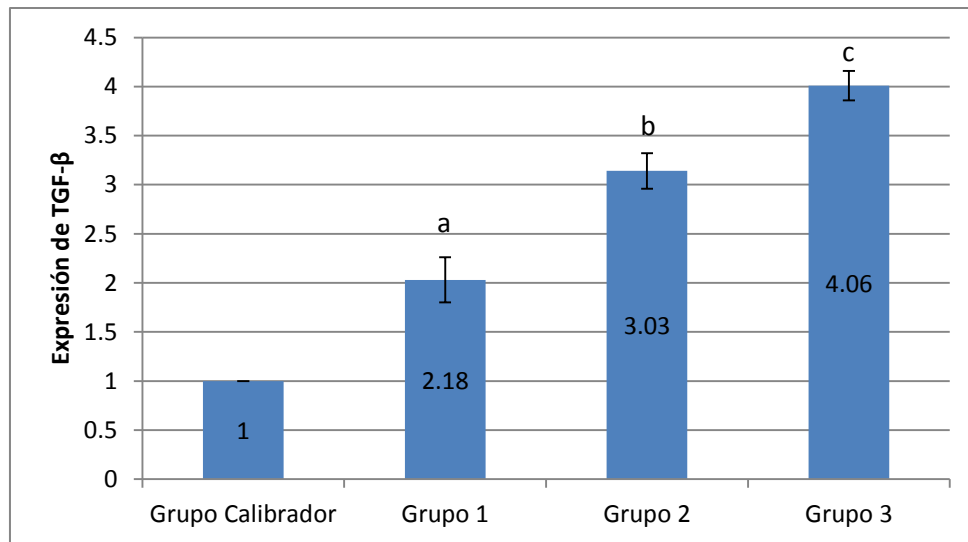


Figura 18. Niveles de expresión de TGF- β en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar de la expresión de los grupos etarios evaluados. ^{a,b,c} Letras diferentes sobre las columnas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

4.7. Expresión de GATA3

Se observa una expresión ascendente del gen de GATA3 en las primeras semanas de vida, alcanzando un pico máximo en los animales del grupo 2 para luego disminuir ligeramente en los animales del grupo 3. Los valores Ct variaron dentro de un rango de 24.5 hasta 28.4. Los productos amplificados tuvieron valores de Tm que oscilaron entre los 85.4 a 86.1 ° C demostrando la amplificación de un producto único y específico. Todos los animales presentaron niveles detectables de ARNm de este gen.

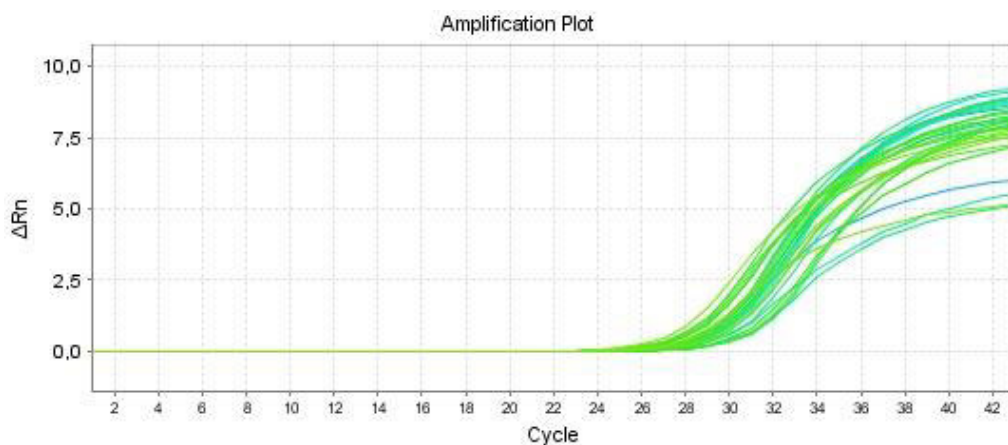


Figura 19. Curva de amplificación (Ct) con el set de oligonucleótidos para GATA3 en mucosa intestinal de crías de alpacas sanas. Los productos tuvieron un Ct entre 24.5 y 28.4

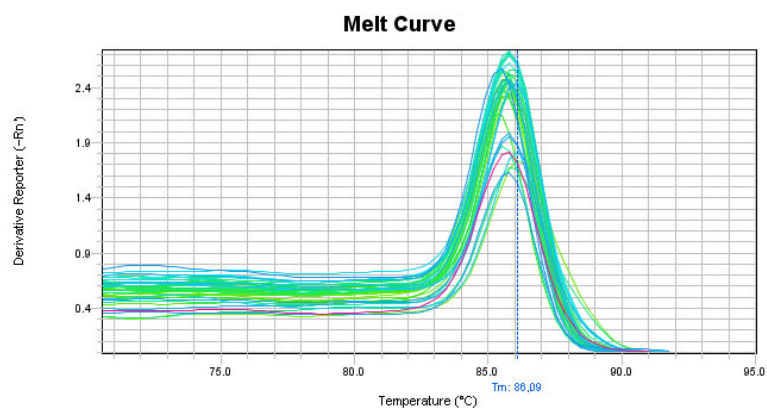


Figura 20. Curvas de disociación (T_m) de los productos amplificados con el set de oligonucleótidos para el gen GATA3 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Los valores de T_m oscilaron entre 85.4°C a 86.1° C

La cuantificación relativa de la expresión del gen GATA3 mostró que los animales del grupo 1, 2 y 3 respectivamente expresaron 1.24 ± 0.12 , 1.56 ± 0.16 , 1.16 ± 0.13 veces este gen con respecto al grupo calibrador (Figura 21). La prueba de ANOVA de una vía concluye que existe diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en al menos uno de los grupos etarios. La prueba de Bonferroni señala que existe diferencia estadísticamente significativa solo entre los grupos 1 y 2, y entre los grupos 2 y 3.

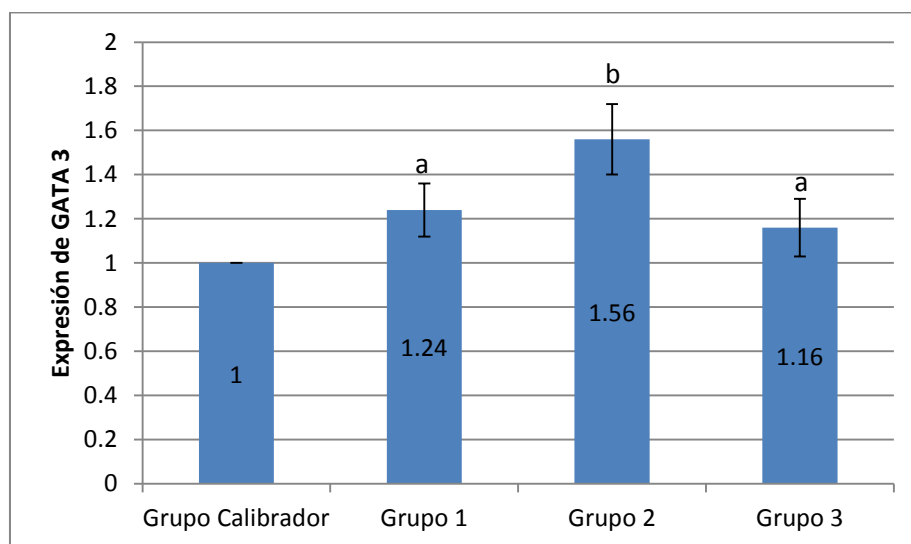


Figura 21. Niveles de expresión de GATA3 en mucosa intestinal de crías de alpaca sanas. Cada barra representa la media \pm la desviación estándar de la expresión de los grupos etarios evaluados. ^{a,b} Letras diferentes sobre las columnas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.05$)

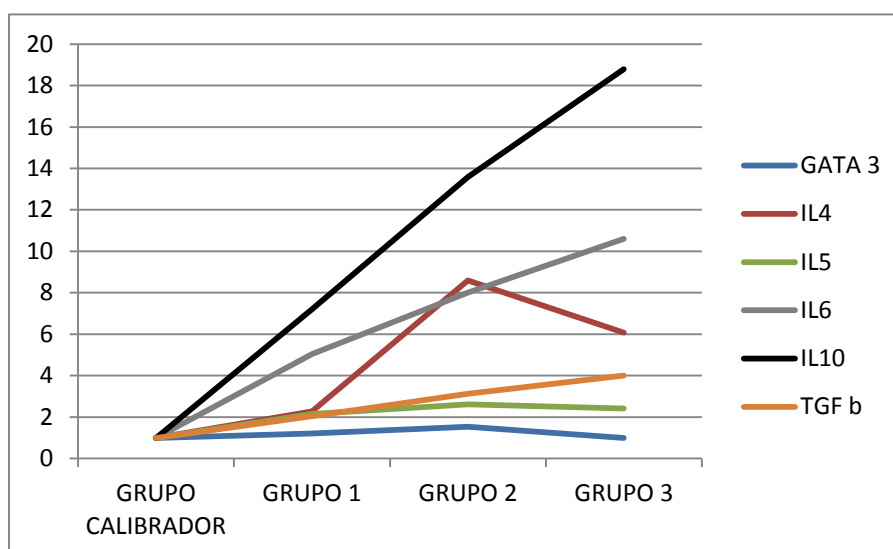


Figura 22. Expresión de GATA3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y TFG- β en mucosa intestinal de crías de alpacas clínicamente sanas. Las líneas representan la media de la expresión en los diferentes grupos etarios evaluados

Cuadro 3. Niveles de Expresión de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β y GATA3 en mucosa intestinal en crías de alpacas clínicamente sanas en los diferentes grupos etarios

Genes	Calibrador	Grupo Etario		
		1	2	3
IL-4	1	2.48 \pm 0.26	8.59 \pm 0.30	6.58 \pm 0.48
IL-5	1	2.15 \pm 0.13	2.65 \pm 0.11	2.44 \pm 0.10
IL-6	1	5.04 \pm 1.06	8.00 \pm 1.10	10.6 \pm 1.29
IL-10	1	7.21 \pm 1.02	13.53 \pm 1.26	18.77 \pm 1.48
TGF- β	1	2.18 \pm 0.23	3.03 \pm 0.18	4.06 \pm 0.15
GATA3	1	1.24 \pm 0.12	1.56 \pm 0.16	1.16 \pm 0.13

4.8 Análisis histopatológico

Los resultados del estudio histopatológico de los animales clínicamente sanos determinaron que el 44% (8/18) de los animales no presentaron lesiones aparentes y el 56% (10/18) de los animales presentaron una leve enteritis catarral aguda difusa (Figura 25). El 84% (5/6) de los animales del grupo 1 no presentaron lesiones aparentes, a excepción de una muestra que presentó leve enteritis catarral aguda difusa (cuadro 4), donde se encontró cuerpos basófilos, esféricos u ovoides unidos al borde en cepillo del epitelio compatible con *Cryptosporidium* spp (Figura 23). El 66 % (4/6) de los animales del grupo 2 presentaron leve enteritis catarral aguda difusa y solo el 34% (2/6) no mostraron lesiones aparentes (cuadro 4). Los animales que presentaron enteritis catarral mostraron hiperplasia de tejidos (enterocitos y acinos glandulares), infiltración de leucocitos y pérdida del revestimiento epitelial. Se detectó en un animal de 13 días de edad la presencia de cuerpos basófilos compatibles con *Cryptosporidium* spp. El 84% (5/6) de los animales del grupo 3 presentó leve enteritis catarral aguda difusa (cuadro 4), encontrando en un animal la presencia de quistes parasitarios, compatibles con *Eimeria* spp (Figura 24) y solo el 16% (1/5) no presentó lesiones aparentes.

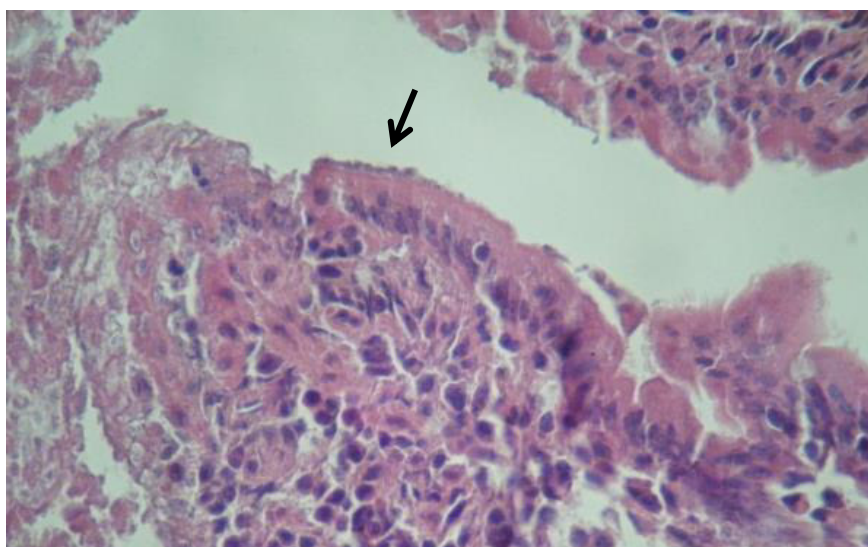


Figura 23. Yeyuno de alpaca de 8 días de edad. Presencia de *Cryptosporidium* spp en el ápice de la mucosa intestinal. HE, 400x

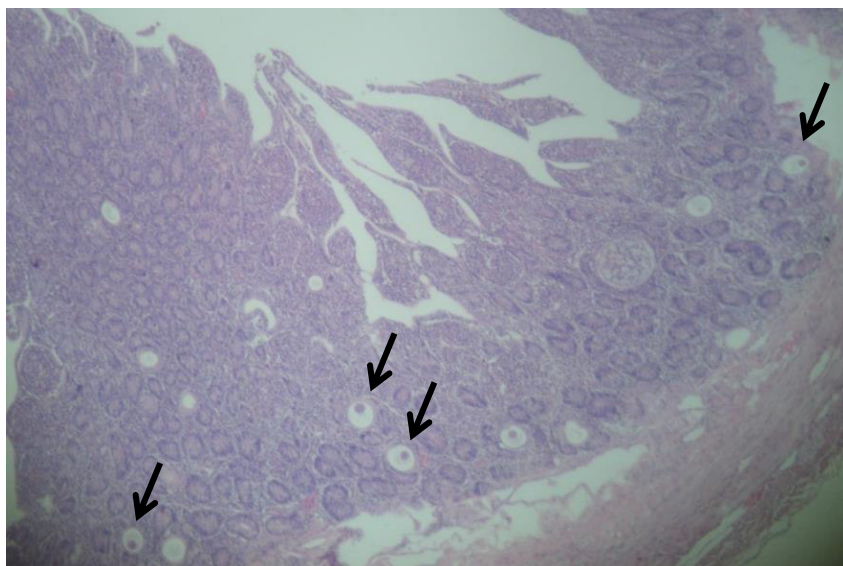


Figura 24. Yeyuno de alpaca de 47 días de edad. Presencia de quistes parasitarios compatibles con *Eimeria* spp HE, 100x

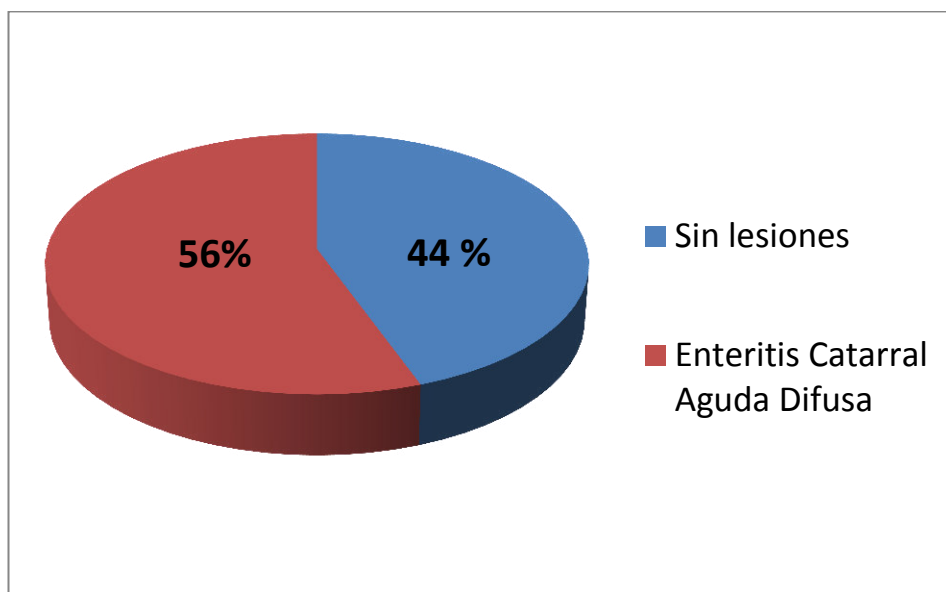


Figura 25. Porcentaje de lesiones histopatológicas en yeyuno de crías de alpacas clínicamente sanas

Cuadro 4. Frecuencia de lesiones histopatológicas por grupos etarios en yeyuno de crías de alpaca clínicamente sanos

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
Sin Lesiones	5	2	1
Enteritis Catarral Aguda Difusa	1	4	5

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se tuvo por objetivo analizar la cinética de expresión del ARNm de las citoquinas del perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β) y su factor transcripcional GATA3 en alpacas clínicamente sanas. Estas citoquinas evocan una fuerte respuesta de anticuerpos además de tener un efecto antiinflamatorio inhibiendo la inmunidad celular, también interviene en reacciones alérgicas y contra parásitos gusanos (Romagnani, 2000).

Luego de realizar la RT -PCR tiempo real con el set de oligonucleótidos diseñado para los genes de las citoquinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TGF- β y el factor transcripcional GATA3, fue detectado el ARNm en todos los individuos, a excepción de IL-4 donde solo un animal de 14 días no tuvo niveles detectables por lo que no se consideró en los promedios de animales de su grupo etario. En un estudio de mucosa intestinal de crías de alpacas, el ARNm del gen de IL-4 no se pudo detectar en un 24% (8/33) y el ARNm del gen de IL-10 no se detectó en un 18% (3/33) (Chiok, 2012), el cual usó cebadores reportados por Odbileg *et al* (2005) basados en secuencias de bovinos y camellos. En este trabajo se utilizó cebadores diseñados en base de secuencias de *Vicugna pacos* obtenidas del GenBank, ambos estudios fueron realizados en la mucosa intestinal de las crías de alpacas durante el primer mes de vida y utilizando la RT PCR tiempo real. La detección de ARNm es influenciada por la metodología y la conservación de las muestras, ya que este ácido nucleico es muy proclive a sufrir cortes y desnaturalización por acción de nucleasas endógenas.

La disponibilidad de tener secuenciados los genes de las interleucinas u otras citoquinas del sistema inmune de alpacas en el Genbank ha permitido diseñar los oligonucleótidos cebadores, logrando amplificar productos de un tamaño adecuado para la técnica de PCR en tiempo real. Los productos amplificados tuvieron un tamaño de 201 pb (GAPDH), 195 pb (IL-4), 202 pb (IL-5), 197 pb (IL-6), 205 pb (IL-10), 185 (TGF- β) y 201 pb (GATA3) (Cuadro 2) como se predijo al diseñar los cebadores. Se comprobó la especificidad de los productos amplificados al existir concordancia con sus respectivos valores de temperatura

de disociación (T_m) de los productos finales establecidos previamente. Los valores de T_m de los productos amplificados tuvieron valores que oscilan entre 82.3 a 83 °C para IL-4 (Figura 5), 74.9 a 75.4°C para IL-5 (Figura 8), 78.5 a 79.0 ° C para IL-6 (Figura 11), 83.1.a 83.8 ° C para IL-10 (Figura 14), 84.8°C a 85.40° C para TGF- β (Figura17), y 85.4 a 86.1 °C para GATA3 (Figura 20) obteniendo temperaturas de disociación esperadas para el tamaño y secuencia previamente establecidos en el diseño de primer y la región a amplificar. Cabe resaltar, que la temperatura de disociación se ve influenciada por el contenido de GC, tamaño de los amplicones y la secuencia de los mismos (Ririe *et al.*, 1997). En este trabajo las T_m de los productos obtenidos variaron mínimamente y son consideradas específicas por el reducido rango observado. Es posible que estas diferencias sean resultado de las variaciones de lectura propias del termociclador o pequeñas fallas de la polimerasa en el proceso de polimerización de la cadena nucleotídica. El presente trabajo no puede establecer con certeza la existencia de polimorfismos o isoformas procedentes de mecanismos de recombinación génica propias de la generación de los ARNm de las citoquinas estudiadas, aunque no se observaron productos que generen dos curvas de disociación en los resultados de cada muestra. Es necesaria la realización del secuenciamiento nucleotídico de los productos del RT-PCR tiempo real para identificar tales variaciones y emplear técnicas avanzadas para develar las implicancias de tales cambios y sus efectos sobre los individuos en caso se presenten.

La combinación de los factores ambientales y el manejo al que están expuestos los animales en estudio promueve la presentación de la cinética de expresión de las citoquinas observadas. Los animales en estudio han sido criados en condiciones semi intensivas, siendo el muestreo realizado en épocas de parición y empadre, condicionando un alto movimiento de animales entre los rebaños y susceptibilidades fisiológicas de madres y crías. Además, este periodo coincide con las altas temporadas de lluvia, favoreciendo el crecimiento de los pastos y la proliferación de patógenos como *Clostridium perfringens* (Pérez *et al.*, 2012), *Eimeria* spp (Rodríguez *et al.*, 2012), *Cryptosporidium parvum* (Palacios, 2008; Villacorta *et al.*, 2009), *E.coli* spp (Luna *et al.*, 2012; Mori *et al.*, 2014), *Giardia* spp (Gomez-Couso *et al.*, 2012; Gomez-Puerta *et al.*, 2014), *Rotavirus* (Morales *et al.*, 2007) y *Betacoronavirus 1* (Luna *et al.*, 2015).

En general, el perfil de expresión de citoquinas Th2 en el yeyuno de alpacas obtenido en este trabajo comprueba su producción desde el nacimiento y su incremento a medida que

aumenta la edad. Esto se debe al estímulo que reciben durante la implementación de la flora microbiana, que inducen la expresión de IgA como lo demuestra Dionisio *et al* en el 2014 en crías de alpacas clínicamente sanas, mostrando un mayor incremento en animales enfermos; esta expresión se asocia al aumento de la producción de citoquinas del perfil Th2 obtenidas en el presente estudio. Reyes en el 2015 también demuestra que la expresión de IgA en la mucosa intestinal de alpacas sanas aumenta de manera progresiva al aumentar la edad; sin embargo, a pesar de que las citoquinas del perfil Th2 no muestran una elevada expresión en comparación con las citoquinas del perfil Th1 (Chiok, 2012; Watanabe, 2016), se puede concluir que no es necesario una elevada expresión de las citoquinas Th2 para estimular la producción de IgA, a pesar de existir un predominio Th1.

La estructura histológica del yeyuno de alpaca nos muestra que tiene todos los componentes celulares para una apropiada respuesta inmune, tanto una respuesta innata y adaptativa celular y humoral (Roca et al, 2014). En nuestro caso la producción de citoquinas que regulan la expresión de la IgA de mucosa intestinal estaría siendo estimulada por citoquinas de diversas células. La producción de TGF- β se debe principalmente por las células Treg; sin embargo, también son fuente importante de producción de esta citoquina las células dendríticas CD103+, macrófagos intestinales y enterocitos (Biancheri *et al.*, 2014). La principal fuente de IL-4 e IL-5 son las células Th2; sin embargo, existen otras células que también producen estas citoquinas como son los mastocitos, basófilos, eosinófilos y células linfoides innatas 2 (Wynn, 2015). La producción de IL-10 también se ve regulada por los linfocitos Th2, sin embargo casi todas las células del sistema inmune producen IL-10, como los linfocitos Treg, Th1, linfocitos B, macrófagos, células dendríticas entre otros (Saraiva y O'Garra, 2010). IL-6 es producida por linfocitos Th2 pero existen otras células que también son fuente importante de esta citoquina como las células epiteliales y células mononucleares de lámina propia (Kusugami *et al.*, 1995). Teniendo en cuenta que el estudio evalúa todo el tejido yeyunal, el balance en la producción de todas las citoquinas proviene de la interacción de todos los tipos celulares estimulados, capaces de producir las citoquinas evaluadas en el tejido muestreado.

El análisis de ARNm del gen de IL-4 manifestó un patrón de expresión ascendente y gradual alcanzando el máximo valor en los animales del grupo 2 y descendiendo en los animales del grupo 3. Este mismo patrón observó Chiok en el 2012 al analizar esta

citoquina, pero encontrando valores mucho más altos (81.6, 211 y 84, 3 veces la expresión del gen de IL-4 con respecto al calibrador en la primera, tercera y quinta semana de edad respectivamente) en comparación a los encontrados en este trabajo (2.48, 8.59 y 6.58 veces la expresión del gen de IL-4 con respecto al calibrador en los animales del grupo 1, 2 y 3 respectivamente). Estas diferencias en los niveles de expresión pueden relacionarse a las variaciones en las condiciones ambientales que se presenta al ser realizado en diferentes años (cantidad de precipitación pluvial, temperatura, humedad) a pesar de haberse realizado en la misma zona de Marangani. Otro factor determinante es la implementación de la técnica de cuantificación de ARN total en este trabajo, permitiendo realizar la RT-PCR con concentraciones iniciales conocidas en todas las muestras, a diferencia de otros trabajos donde solo se trabajó con volúmenes, siendo de vital importancia en un trabajo de cuantificación. Sin embargo, pese a tener distintos niveles de expresión, evidencian la misma cinética a través de la edad, confirmando el mismo comportamiento inmunológico.

El aumento de la expresión de IL-4 se asocia a una función de activación y multiplicación de células B productoras de inmunoglobulinas, además de una diferenciación a células Th2. IL-4 cumple un importante rol en la diferenciación de células TCD4+ vírgenes a células Th2 (Paul, 2010); aunque existen vías alternativas de diferenciación a células Th2 independiente de IL-4, no producen una respuesta tan eficiente como la estimulación por la vía de IL-4 (Kopf *et al.*, 1993). La citoquina IL-4 en este trabajo no muestra una expresión muy elevada con respecto al grupo calibrador; esta baja expresión se asocia a una escasa polarización hacia un perfil Th2 en el primer mes de vida, concordando con otros estudios que muestran una mayor expresión de citoquinas de perfil celular (IFN γ) sobre la expresión de IL-4 (Chiok, 2012, Watanabe 2016). Esto también se confirma al encontrar en el análisis histopatológico la presencia de *Cryptosporidium* spp y *Eimeria* spp; estos patógenos estimulan una respuesta inmune celular mediada principalmente por IFN γ y TNF α (Ovington *et al.*, 1995) teniendo influencia en los resultados obtenidos.

El análisis de ARNm del gen de IL-5 manifestó el mismo patrón de expresión de IL-4. Sin embargo, manifiesta una baja expresión con respecto al calibrador. IL5 tiene la capacidad de estimular la inmunidad humoral (Tizard, 2013); Sin embargo, a pesar de su baja expresión, esta sería suficiente para activar la producción de IgA en mucosa intestinal de alpacas (Dionisio *et al.*, 2014; Reyes, 2015). Su expresión también se asocia a una baja respuesta de eosinófilos, teniendo en cuenta que los animales en estudio cuentan con un rol

de desparasitación. No obstante; existen trabajos que confirman una alta prevalencia entre los 5 meses a un año (Contreras et al., 2014; Pérez et al., 2013), aunque otras referencias mencionan que la edad más susceptible es a los 3 a 4 meses de edad y después del destete (Bustinza, 2000). Cabe resaltar, que IL-5 tiene un rol en la diferenciación, proliferación y reclutamiento de eosinófilos (Coffman et al., 1989) y su respuesta contra nematodos, céstodos y trematodos (Leder y Weller, 2000).

El patrón de expresión de IL-4 e IL-5 concuerda también con el patrón de expresión mostrado por GATA3, manifestando una expresión con un comportamiento de parábola. Esta concordancia se debe a la regulación del factor de transcripción en la expresión directa de respectivas citoquinas, reestructurando la cromatina para abertura del locus brindando accesibilidad de otros factores transcripcionales, además de aumentar la expresión de respectivos genes (Abbas *et al.*, 2015). No obstante, la expresión de GATA3 manifiesta una expresión similar con respecto al grupo calibrador, en donde se observa una alta producción según el Ct obtenido en el PCR tiempo real (anexo 6); el mismo comportamiento se observa con otros factores de transcripción como STAT 1 y STAT 4 (Watanabe, 2016). El alto Ct de GATA3 en el grupo calibrador, se relaciona con los descubrimientos actuales sobre las diversas funciones de GATA3 en el desarrollo de diversos tejidos a nivel embrionario y post natal (Kouros-Mehr *et al.*, 2008; Pandolfi *et al.*, 1995). A pesar de compartir la misma cinética con IL-4 e IL-5, los niveles de expresión de GATA3 no necesariamente deben de ser los mismos de los genes que regula, debido a que GATA3 en bajos niveles de expresión es suficiente para inducir la expresión de IL-4 siempre que haya una activación de STAT5, activado por IL-2 (Zhu *et al.*, 2003). No obstante, la capacidad de GATA3 para inducir IL-4 sin la activación de STAT5 se ve limitada (Cote-Sierra *et al.*, 2004) y STAT5 es incapaz de inducir IL-4 sin la presencia de GATA3 (Zhu *et al.*, 2004).

La Expresión de TGF- β en este estudio mostró una expresión ascendente con la edad, alcanzando su máxima expresión en los animales del grupo 3. La expresión mostró valores de (2.18, 3.03 y 4.06 veces este gen con respecto al grupo calibrador para los animales del grupo 1, 2 y 3 respectivamente). Este comportamiento ascendente se observa en diversos estudios en donde la presencia de diversos microorganismos estimulan su expresión; Así tenemos que en ratones ante el estímulo de *Chlamydia trachomatis* se ve aumentada la expresión de TGF- β , también en monocitos humanos ante el estímulo de *Mycobacterium*

tuberculosis, en macrófagos intestinales de ratón ante la presencia de *Mycobacterium avium*, ante la presencia de protozoos (*Toxoplasma gondi*, *Leishmania* spp y *Trypanosoma cruzi*) y en infecciones virales como Citomegalovirus, Hepatitis C, VIH (Reed, 1999). Además, Herrera en el 2012 analizó la expresión de la citoquina TGF- β en mucosa yeyunal de crías de alpaca encontrando un aumento de la expresión en animales clínicamente sanos y un mayor aumento en animales enfermos, confirmando que la expresión de TGF- β es necesaria y está presente ante diferentes estímulos microbiológicos en el intestino.

Esta expresión progresiva se asocia a 2 importantes funciones de TGF- β . Una de las funciones es la regulación del sistema inmune estimulando la inducción de células T reguladoras FOXP3+ de importante rol en la tolerancia inmunológica además de la reducción de producción de citoquinas pro inflamatorias (Worthington *et al.*, 2011). Esta importante función de regulación es necesaria para impedir que la respuesta inmune no sea nociva para el organismo ya que en ratones deficientes de TGF- β presentan severas inflamaciones multi-orgánicas y enfermedades inflamatorias entéricas (Becker *et al.*, 2006). Sin embargo, esto puede ser aprovechado por patógenos, sabiendo que la sobreproducción de TGF- β permite la supervivencia e incremento en la proliferación de microorganismos, encontrándose sobre expresada en animales con mala nutrición (Dai y Murray, 1998). La segunda importante función de TGF- β es la producción de IgA, de importante función neutralizante, por las células plasmáticas en el intestino (Cerutti y Rescigno, 2008), existiendo deficiencia de IgA en ratones sin el receptor T β RII en linfocitos B (Cazac y Roes, 2000).

La Expresión de IL-10 en este estudio mostró una expresión ascendente con la edad, alcanzando su máxima expresión en los animales del grupo 3. La expresión mostró valores de (7.21, 13.53, 18.77 veces este gen con respecto al grupo calibrador para los animales del grupo 1, 2 y 3 respectivamente). En diversos estudios IL-10 aumenta su expresión en presencia de patógenos; como en presencia de antígenos clostridiales (More, 2013; Tuovinen *et al.*, 2013) y de protozoos intracelulares aun en presencia de una elevada expresión de IFN γ (Jankovic *et al.*, 2007). Chiok en el 2012, analizó la expresión del gen de IL-10 en mucosa yeyunal de crías de alpaca clínicamente sanas observando un patrón de expresión ascendente, mostrando un descenso en la 5ta y 6ta semana de vida; a diferencia de este trabajo donde se muestra una expresión ascendente con la edad. Esta diferencia podría deberse a que los animales en el trabajo de Chiok alcanzaron la regulación inmune

con anticipación con respecto a los animales de este estudio; cabe resaltar, que ambos trabajos son realizados en diferentes años, pudiendo existir algunas diferencias climatológicas, microbiológicas y de manejo que podrían estar influenciando en los resultados obtenidos. Además, se sabe que IL-10 al controlar las respuestas inmunes inflamatorias, promueve la tolerancia inmunológica en mucosas manteniendo la homeostasis, siendo necesario para el establecimiento de un mutuo beneficio de comensalismo con la microbiota intestinal; sin embargo, esto puede ser aprovechado por algunos patógenos, facilitando su colonización y proliferación (Kole y Maloy, 2014).

IL-6 mostró una expresión progresiva con la edad alcanzando su máxima expresión en los animales del grupo 3; esta expresión ascendente se asocia con la labor de IL-6 en la producción de IgA y su función en la respuesta inflamatoria (Tizard, 2013). Cultivos de células B de placas de Peyer con IL-6 muestran un incremento de 8 veces la producción de IgA, mientras el incremento de secreción de IgM o IgG no se vio afectado (Beagle *et al.*, 1991). En otro estudio, aislados de células B IgA+ obtenidos de GALT de apéndice de humano expresaron altos niveles del receptor de IL-6 (IL-6R) y responden a IL-6 con un incremento significativo en el número de células IgA (Fujihashi, *et al.* 1992); además, el uso de IL-6 recombinante aumenta en un 50% la expresión de IgA en intestino de ratones (Bao *et al.*, 1998), confirmando la importancia de la expresión de IL-6 para la producción de IgA en intestino. Sin embargo, IL-6 también tiene un importante rol en la respuesta inflamatoria en el intestino estimulando la activación del NF- κ B, un central mediador de la respuesta inflamatoria intestinal (Wang *et al.*, 2003). Esta función pro inflamatoria estaría siendo predominante al contrastar con los resultados histopatológicos, mostrando más individuos con presencia de leve enteritis catarral aguda difusa al incrementar la edad, siendo influenciado por patógenos como *Eimeria* spp o *Cryptosporidium* spp encontrados en este trabajo. En modelos murinos, IL-6 aumenta su expresión ante el estímulo de patógenos como *Citrobacter rodentium* (Dann *et al.*, 2008) y *Giardia lamblia* (Zhou *et al.*, 2003), también muestra una elevada expresión de IL-6 en ratones y pollos infectados con *Eimeria tenella* (Lynagh *et al.*, 2003), en presencia de *Cryptosporidium parvum* (Maillo *et al.*, 2000) y en presencia de exotoxinas de *Clostridium perfringens* en monocitos humanos (Krakauer *et al.*, 1997), demostrando que la expresión de IL6 aumenta al mediar una respuesta inmune contra patógenos, siendo necesaria para su control.

Se debe tener en cuenta que la expresión de las citoquinas en estudio se analiza de manera independiente; sin embargo, todas tienen una función en conjunto. Tanto IL-4 e IL-5 siguen el patrón de expresión del factor transcripcional GATA3 que estimula su expresión (Abbas *et al.*, 2015) siendo estas citoquinas estimuladoras de la activación y proliferación de células B. IL-6 aumenta su expresión de manera progresiva con la edad y trabaja conjuntamente con IL-4 e IL-5 estimulando la diferenciación de células B a células plasmáticas y producción de inmunoglobulinas, al mismo tiempo que también estimula una respuesta inflamatoria (Carrillo de Albornoz *et al.*, 2006). Simultáneamente, IL-10 y TGF- β aumentan su expresión de manera progresiva al transcurrir los días con la finalidad de regular la respuesta inmune y fomentar la tolerancia contra antígenos inocuos, además de controlar la respuesta inmune montada contra los diversos patógenos del entorno y no se vuelva una respuesta inmune nociva para el organismo (Jarry *et al.*, 2008).

Los resultados observados de todas las citoquinas pueden asociarse a una respuesta inmunológica transitoria debido a la presencia de nuevos antígenos alimenticios y microbiológicos generando un descenso en la respuesta inmune al transcurrir las semanas (Strobel, 2001). Resultados similares pueden apreciarse en otros trabajos donde se estudia la expresión de citoquinas en la mucosa intestinal de alpacas durante el primer mes de vida, donde también refleja un aumento de la respuesta inmune en las primeras semanas de vida para luego mostrar un ligero descenso, posiblemente asociado a un proceso de regulación y tolerancia inmunológica. Bardález en el 2013 demuestra que la expresión de IL-1 α e TNF- α sigue este patrón de expresión a través de la edad, al igual que Chiok en el 2012 al analizar la expresión de IFN- γ e IL-4. Dionisio *et al* en el 2014, encuentra que la expresión de la IgA también tiene este patrón de expresión. More *et al* en el 2011 también encuentra este patrón de expresión al estudiar las α y β defensinas de alpacas clínicamente sanas, demostrando que la inmunidad innata como adquirida sigue este proceso adaptativo a nuevos antígenos. Además también este patrón de comportamiento se ve reflejado en otras especies como en cerdos y ratones (Bailey *et al.*, 2001). Sin embargo, las citoquinas IL-10 y TGF- β no siguen este patrón, mostrando una expresión ascendente con la edad asociándose a su indispensable labor en la inhibición de la respuesta inmune (Abbas, 2015).

Además se debe tener en cuenta la influencia de factores inmunoestimuladores como el calostro. Las crías de alpacas nacen hipogammaglobulinémicas debido a la placentación

epiteliocorial difusa de los camélidos, condición que las pone en un estado muy vulnerable al nacimiento, siendo el calostro la principal fuente de protección contra patógenos en neonatos al contener principalmente IgG (Whitehead, 2009). Además, existen otros factores de protección inespecíficos como lisosimas, lactoferrina, complemento (Fernández *et al.*, 1994) y células inmunes maternas viables incluyendo linfocitos T y B, neutrófilos, macrófagos que cumplen una función de estimulación en el desarrollo inmunológico (Le Jan, 1996). Trabajos en otras especies muestran como los estímulos del calostro influyen en los neonatos: En bovinos, el calostro contiene citoquinas (IL-1b, IL-6, TNF- α e IFN- γ) que comprometen el desarrollo del sistema inmune (Tizard, 2013); el calostro también tiene propiedades antiinflamatorias sobre las células epiteliales intestinales, inhibiendo la producción de citoquinas inflamatorias a través de la inhibición del NF- κ B (An *et al.*, 2009); en potrillos, el efecto del calostro estimula la expresión de los receptores para TGF- β , además de aumentar el número de células de goblet (Palm *et al.*, 2015); es por eso que el calostro cumple un rol crucial en el neonato, no sólo brindando protección a través de sus inmunoglobulinas y factores inmunológicos no específicos, también brindando estimulación para el buen desarrollo de la inmunidad.

Diversos estudios muestran la respuesta inmune montada para controlar la proliferación de patógenos y como las citoquinas intervienen en este proceso. Pollos infectados con *Eimeria* spp mostraron una elevada expresión de IFN γ , IL-2, IL6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-16 e IL-18; sin embargo, la expresión de IL-4 e IL-13 disminuye al retarse con este patógeno, mostrando una baja expresión del perfil Th2 en su control (Hong *et al.*, 2006). En ratones la expresión de TNF- α e IFN- γ mostró ser necesarios para el control de la infección de *Eimerias* spp y otros protozoarios (Ovington *et al.*, 1995). IFN- γ y TNF- α evidenciaron efectividad en el control de *Cryptosporidium parvum* confirmando que la principal respuesta inmune montada contra la infección de este patógeno es la celular. En ratones knockout IFN γ -/- se mostró susceptibilidad significativa a la infección de *Cryptosporidium parvum*; no obstante, anticuerpos anti IL-4 e IL-5 mostraron un aumento del nivel de infección manifestando que estas citoquinas también interviene en el control de *Cryptosporidium parvum* (Petry *et al.*, 2010). *E.coli* estimula la expresión de citoquinas pro inflamatorias como IL-1b, IL-8 y TNF- α (Walle *et al.*, 2013) promueve su control. En células epiteliales y monocitos, se demostró que estas células expresan altamente IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α al retarse con *E.coli* (Agace *et al.*, 1993). Estudios *in vitro* demostraron

que los leucocitos expresan TNF- α , IL-1 α , e IL-1 β , IFN γ , IL-2, IL-10 en presencia de *Clostridium perfringens* (More, 2013; Tambillo *et al.*, 2013), produciendo citoquinas pro y antiinflamatorias. Por lo descrito anteriormente, se sugiere que la asociación de los microorganismos en el ambiente estén influyendo en la respuesta del sistema inmune encontrada en este trabajo.

En este estudio, el análisis de la expresión de ARNm de las citoquinas IL-4, IL-5, IL-6, TGF- β , IL-10 y el factor transcripcional GATA3 fueron detectados en los primeros días de vida y una leve expresión en los fetos 11 meses, demostrando que existe un sistema inmune ya desarrollado y capaz de montar una respuesta inmune desde el nacimiento. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Roca en el 2014, donde se evidencia la presencia de tejido linfoide asociado a mucosa intestinal anterior al nacimiento tanto en yeyuno como en íleon de alpacas, siendo las Placas de Peyer ileales las que sufren una involución y las Placas de Peyer yeyunales las que persisten durante toda la vida del animal, siendo ambas activas post nacimiento.

El análisis histopatológico de la mucosa intestinal del yeyuno en alpacas clínicamente sanas mostró individuos sin lesiones aparentes y animales con leve enteritis catarral al aumentar la edad a pesar de ser animales clínicamente sanos. Es común encontrar alguna lesión histológica subclínica en los neonatos, debido a que en esta etapa de vida se establecen microorganismos en el tracto intestinal, interactuando con el epitelio y estimulando respuestas inmunes locales (Round y Mazmanian, 2009); siendo necesarias para el desarrollo del sistema inmune. Además, los resultados histopatológicos coinciden con el incremento de expresión de citoquinas encontradas en este trabajo como son las IL-4, IL-5 e IL-6, manifestando una expresión progresiva con la edad. Sin embargo, la IL-6 sigue aumentando su expresión alcanzando su máximo nivel en los animales del grupo 3, concordando con una mayor proporción de animales que presentan una leve enteritis catarral aguda difusa en animales de mayor edad en este estudio; resaltando que IL-6 es una citoquina que tiene un importante rol en la respuesta pro inflamatoria y también media la respuesta adaptativa por linfocitos Th17 (Kimura y Kishimoto, 2010). También se detectó la presencia de cuerpos basófilos, esféricos u ovoides unidos al borde en cepillo del epitelio compatible con *Cryptosporidium* spp en 2 animales de 8 y 13 días de edad y la presencia de quistes parasitarios compatibles con *Eimeria* spp en un animal de 47 días de edad. Estudios han identificado la presencia de *Cryptosporidium* spp tanto en animales

menores de 15 días de edad con presencia y sin presencia de diarreas, considerándose como un factor de riesgo para la existencia de procesos diarreicos (Palacios, 2008; Villacorta *et al.*, 2009). La prevalencia de *Eimeria* spp en alpacas menores de 30 días de edad es muy baja, existiendo una mayor prevalencia en alpacas de 31 a 45 días de edad (Rodríguez., *et al* 2012), detectados tanto en animales con presencia y ausencia de diarreas; además de ser considerado como un factor de riesgo para la aparición de la enterotoxemia (Rosadio, 2010). La presencia de *Cryptosporidium* spp y *Eimeria* spp en el análisis histopatológico, demuestra que el sistema inmune de las alpacas es retado constantemente por diversos patógenos, estimulando un aumento de la expresión de citoquinas con la finalidad de mediar una respuesta para lograr su control.

En otros estudios donde se realiza un análisis histopatológico en la mucosa intestinal de crías de alpacas con enteropatías, la enteritis necrótica difusa aguda fue la lesión histológica con mayor frecuencia 68% (21/31), logrando asociar las lesiones a bacterias (6/31) a *Eimeria* spp (2/31) y a *Cryptosporidium* spp (2/31) (Herrera, 2012). Chiok en el 2012 encontró que el 83% de los animales con enteropatía en estudio (30/36) presentaron enteritis necrótica aguda difusa, lográndose asociar las lesiones a bacterias (7/31) y a *Cryptosporidium* spp (3/36). Confirmando que *Cryptosporidium* spp y *Eimeria* spp son uno de los principales patógenos que retan el sistema inmune de las alpacas; además, las lesiones encontradas en animales con enteropatías son severas con respecto a las encontradas en este trabajo teniendo en cuenta que son animales clínicamente sanos.

VI. CONCLUSIONES

- La expresión de las citoquinas IL-4, IL-5 y GATA3 en crías de alpacas clínicamente sanas se mostró ascendente en las primeras semanas de vida alcanzando su máxima expresión en los animales 10 a 21 días, descendiendo ligeramente en los animales de 26 a 47 días de edad.
- La expresión de las citoquinas IL-6, IL-10 y TGF- β en crías de alpaca clínicamente sanas manifestó una expresión progresiva con la edad, alcanzando su máximo valor en los animales de 36 a 47 días de edad.
- El análisis histopatológico mostró un aumento de individuos con presencia de leve enteritis catarral aguda difusa al aumentar la edad, alcanzando un 84% (5/6) en los animales de 26 a 47 días de edad, asociado a la presencia de patógenos como *Cryptosporidium* spp. y *Eimeria* spp, influyendo en los resultados de obtenidos.

VII. SUGERENCIAS

- Evaluar los patrones cinéticos de expresión de los factores de transcripción correspondiente a otros linajes de linfocitos T colaboradores como FOXP3 (Treg) o ROR γ t (Th17).
- Identificar y cuantificar la presencia de otros linajes celulares tanto de inmunidad innata como adquirida en la mucosa intestinal a través de un análisis inmunohistoquímico o de citometría de flujo, con la finalidad de analizar su influencia en la respuesta inmune.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

Al programa nacional de innovación para la competitividad y productividad (INNÓVATE - PERÚ) del Ministerio de la Producción por financiar esta investigación a través del proyecto N°180 FINCyT- IB -2013.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2015.** Inmunología celular y molecular. 8va edición. Madrid: Elsevier.
2. **Agace W, Hedges S, Andersson U, Andersson J, Ceska M, Svanborg C. 1993.** Selective cytokine production by epithelial cells following exposure to *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. 61(2): 602-609.
3. **Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, Taniguchi M, Grusby M, DeKruyff M, Umetsu, DT. 2003.** Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nature medicine* 9(5): 582-588.
4. **Ameghino E, De Martini J. 1991.** Mortalidad en crías de alpacas. Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA). UNMSM. Lima. 71p.
5. **Amsen D, Antov A, Flavell RA. 2009.** The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation. *Nature Reviews Immunology* 9(2): 116-124.
6. **An MJ, Cheon JH, Kim SW, Park JJ, Moon CM, Han SY, Kim ES, Kim TI, Kim, W. H. (2009).** Bovine colostrum inhibits nuclear factor κ B-mediated proinflammatory cytokine expression in intestinal epithelial cells. *Nutrition research*, 29(4), 275-280.
7. **Bailey M, Plunkett FJ, Rothkötter HJ, Vega-Lopez MA, Haverson K, Stokes CR. 2001.** Regulation of mucosal immune responses in effector sites. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60(04), 427-435.
8. **Bao S, Beagley KW, Allanson M, Husband AJ. 1998.** Exogenous IL-6 promotes enhanced intestinal antibody responses in vivo. *Immunology and cell biology*. 76(6): 560-562.
9. **Bardález C, Manchego S, Chiok LK, Sandoval C., More, B., Danilo Pezo C, Ramírez V. 2013.** Cinética de expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 alfa (IL-1 α) en mucosa intestinal de crías de alpaca (vicugna

pacos) sanas y con enteropatía. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 24(3): 381-389.

10. **Beagley KW, Eldridge JH, Aicher WK, Mestecky J, Di Fabio S, Kiyono H, McGhee JR. 1991.** Peyer's patch B cells with memory cell characteristics undergo terminal differentiation within 24 hours in response to interleukin-6. *Cytokine*, 3(2): 107-116.
11. **Becker C, Fantini MC, Neurath MF. 2006.** TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 17(1): 97-106.
12. **Biancheri P, Giuffrida P, Docena GH, MacDonald TT, Corazza GR, Di Sabatino A. 2014.** The role of transforming growth factor (TGF)- β in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut. *Cytokine & growth factor reviews*. 25(1): 45-55.
13. **Bron PA, Van Baarlen P, Kleerebezem M. 2012.** Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1): 66-78.
14. **Brown MA, Hural J. 1997.** Functions of IL-4 and control of its expression. *Critical Reviews in Immunology*, 17(1).
15. **Brucklacher-Waldert V, Carr EJ, Linterman MA, Veldhoen M. 2014.** Cellular plasticity of CD4+ T cells in the intestine. *Frontiers in immunology*, 5.
16. **Bulek K, Swaidani S, Aronica M, Li X. 2010.** Epithelium: the interplay between innate and Th2 immunity. *Immunology and cell biology* 88(3): 257-268.
17. **Bustinza JA. 2000.** Enfermedades de alpacas. 2° ed. Arequipa: Universidad Nacional del Altiplano. 346 p.
18. **Caggiano N, Saccodossi N, Gentile T, Barbará M A, Leoni J, De Simone E. 2014.** Caracterización de IgM, IgG Total, IgG1 y anticuerpos de cadena pesada en calostro de llamas ("Lama glama") mediante Elisa. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 8(2): 29-40.
19. **Carrillo de Albornoz SA, García KA, Bascones MA. 2006.** Papel de la IL-6 y TNF-alfa en la enfermedad periodontal. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral* 18(2): 83-89.
20. **Cazac BB, Roes J. 2000.** TGF- β receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity*. 13(4): 443-451.
21. **Cerutti A, Rescigno M. 2008.** The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity*, 28(6): 740-750.

22. **Chang HD, Helbig C, Tykocinski L, Kreher S, Koeck J, Niesner U, Radbruch A. 2007.** Expression of IL-10 in Th memory lymphocytes is conditional on IL-12 or IL-4, unless the IL-10 gene is imprinted by GATA-3. *European journal of immunology* 37(3): 807-817.
23. **Chiok K. 2012.** Expresión de citoquinas de la respuesta Th1 (IFN- γ e IL-2) y Th2 (IL-4 e IL-10) en mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. Tesis para optar el título de Magíster. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.
24. **Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J, Rennick D. 1989.** Antibody to interleukin-5 inhibits helminth induced eosinophilia in mice. *Science*, 245(4915):308-10.
25. **Contreras N, Chávez A, Pinedo V, Leyva V, Suárez F. 2014.** Helmintiasis en alpacas (*Vicugna pacos*) de dos comunidades de Macusani, Puno, durante la época seca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 25(2): 268-275.
26. **Cote-Sierra J, Foucras G, Guo L, Chiodetti L, Young HA, Hu-Li J, Zhu J, Paul WE. 2004.** Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(11): 3880-3885.
27. **Dai G, McMurray DN. 1998.** Altered cytokine production and impaired antimycobacterial immunity in proteinmalnourished guinea pigs, *Infect. Immun.* 66: 3562–3568.
28. **Daley LP, Gagliardo LF, Duffy MS, Smith MC, Appleton JA. 2005.** Application of monoclonal antibodies in functional and comparative investigations of heavy-chain immunoglobulins in new world camelids. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 12(3): 380-386.
29. **Daley-Bauer LP, Purdy SR, Smith MC, Gagliardo LF, Davis WC, Appleton JA. 2010.** Contributions of conventional and heavy-chain IgG to immunity in fetal, neonatal, and adult alpacas. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(12): 2007-2015.
30. **Dann SM, Spehlmann ME, Hammond DC, Limura M, Hase K, Choi LJ, Eckmann L. 2008.** IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. *The Journal of Immunology*. 180(10): 6816-6826.

31. **Das J, Ren G, Zhang L, Roberts AI, Zhao X, Bothwell AL, Van Kaer L, Shi Y, Das G. 2009.** Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. *J Exp Med* 206(13):2407–2416.
32. **Davis WC, Heirman LR, Hamilton MJ, Parish SM, Barrington GM, Loftis A, Rogers, M. 2000.** Flow cytometric analysis of an immunodeficiency disorder affecting juvenile llamas. *Veterinary immunology and immunopathology*, 74(1), 103-120.
33. **De Almeida CR, Heath H, Krpic S, Dingjan GM, van Hamburg J P, Bergen I., de Nobelen SV, Sleutels F, Grosveld F, Galjart N, Hendriks RW. 2009.** Critical role for the transcription regulator CCCTC-binding factor in the control of Th2 cytokine expression. *The Journal of Immunology*, 182(2), 999-1010.
34. **De Genst E, Saerens D, Muyldermans S, Conrath K. 2006.** Antibody repertoire development in camelids. *Developmental & Comparative Immunology*, 30(1):187-198.
35. **De Lafaille MA, Lafaille JJ. 2009.** Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?. *Immunity* 30(5): 626-635.
36. **Deshmukh GR, Kumar KH, Reddy PV, Rao BS, Mahajan VM. 2012.** M-Cells and Their Role in Mucosal Immunity and Disease Causation. *Journal of Pharmacy Research*, 5(4).
37. **Dionisio J, Manchego A, Chiok KL, Sandoval N, More J, Pezo D, Rivera H. 2014.** Cinética de expresión de inmunoglobulina a en el epitelio intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(2), 151-161.
38. **Drucker C, Gewiese J, Malchow S, Scheller J, Rose-John S. 2010.** Impact of interleukin-6 classic-and trans-signaling on liver damage and regeneration. *Journal of autoimmunity* 34(1): 29-37.
39. **Fagarasan S, Kawamoto S, Kanagawa O, Suzuki K. 2009.** Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annual review of immunology*, 28: 243-273.
40. **Fainboim, L, Geffner, J. 2005.** Introducción a la inmunología humana. Ed. Médica Panamericana.
41. **FAO.2005.** Situación actual de los Camélidos Sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región-Andina. Prólogo) TCP/RLA/2914.

42. **Fernández AS, Padola NL, Esterin SM. 1994.** El calostro, Fuente de Transferencia de la Inmunidad Materna. *Ciencia y Veterinaria*, Córdoba, (22).
43. **Fowler ME, Olander H J. 1990.** Fetal membranes and ancillary structures of llamas (*Lama glama*). *American journal of veterinary research*, 51(9): 1495-1500.
44. **Fujihashi K, Kono Y, Kiyono H. 1992.** Effects of IL6 on B cells in mucosal immune response and inflammation. *Research in immunology*. 143(7): 744-749.
45. **Gálvez-Gastélum FJ, Sandoval-Rodríguez AS, Armendáriz-Borunda J. 2004.** El factor de crecimiento transformante beta como blanco terapéutico. *salud pública de méxico* 46(4): 341-350.
46. **Garcia G, Taillé C, Laveneziana P, Bourdin A, Chanez P, Humbert M. 2013.** Anti-interleukin-5 therapy in severe asthma. *European Respiratory Review* 22(129): 251-257.
47. **Gastl GA, Abrams JS, Nanus DM, Oosterkamp R, Silver J, Liu F, Chen M, Albino AP, Bander NH. 1993.** Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. *International journal of cancer*, 55(1), 96-101.
48. **Gómez-Couso H, Ortega-Mora L, Aguado-Martínez A, Rosadio-Alcántara R, Maturrano-Hernández L, Luna-Espinoza L, Zanabria-Huisa V, Pedraza-Díaz S. 2012.** Presence and molecular characterization of *Giardia* and *Cryptosporidium* in alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. *Vet Parasitol* 187: 414– 420.
49. **Gomez-Puerta LA, Lopez-Urbina MT, Alarcon V, Cama V, Gonzalez AE, Xiao L. 2014.** Occurrence of *Giardia duodenalis* assemblages in alpacas in the Andean region. *Parasitology international*, 63(1), 31-34.
50. **Green-Johnson JM. 2012.** **Immunological Responses to Gut Bacteria** *Journal of AOA C International* Vol. 95, N°. 1
51. **Harmsen MM, Ruuls RC, Nijman IJ, Niewold TA, Frenken LG, de Geus B. 2000.** Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Molecular immunology*, 37(10): 579-590.
52. **Harmsen MM, De Haard HJ. 2007.** Properties, production and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:13–22.
53. **He C, Cheng H, Zhou R. 2007.** GATA family of transcription factors of vertebrates: phylogenetics and chromosomal synten. *Journal of biosciences* 32(3): 1273-1280.

54. **Herrera A. 2012.** Detección de citoquinas inductora y efectora para la diferenciación y función de linfocitos colaboradores 17 (Th 17) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis para optar el título de Magíster. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.
55. **Hershberg RM, Mayer LF. 2000.** Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today* 21: 123-8.
56. **Hong YH, Lillehoj HS, Lee SH, Dalloul RA, Lillehoj EP. 2006.** Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Veterinary immunology and immunopathology*. 114(3): 209-223.
57. **Huang F, Chen YG. 2012.** Regulation of TGF- β receptor activity. *Cell Biosci*, 2(9).
58. **Hunt R, Sauna ZE, AMbudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. 2009.** Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol* 578:23-39.
59. **Hunter CA, Jones SA. 2015.** IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology* 16(5) 448-457.
60. **Hurtado J. 2011.** La enterotoxemia en alpacas: algunos aspectos etiológicos y clínicos.
61. **Hutchins AP, Diez D, Miranda-Saavedra D. 2013.** The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Briefings in functional genomics* 12(6): 489-498.
62. **INEI. 2012.** Resultados definitivos III Censo Nacional Agropecuario CENAGRO.
63. **Itoh K, Hirohata S. 1995.** The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *The Journal of Immunology*, 154(9): 4341-4350.
64. **Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher, A. 2007.** Conventional T-bet⁺ Foxp3⁻ Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *The Journal of experimental medicine*, 204(2): 273-283.
65. **Jarry A, Bossard C, Bou-Hanna C, Masson D, Espaze E, Denis MG, Laboisie CL. 2008.** Mucosal IL-10 and TGF- β play crucial roles in preventing LPS-driven,

- IFN- γ -mediated epithelial damage in human colon explants. The Journal of clinical investigation. 118(3): 1132-1142.
66. **Kadwell M, Fernández M, Stanley HF, Baldi R, Wheeler J, Rosadio R, Bruford MW. 2001.** Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 268 (1485): pp. 2575–2584.
 67. **Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. 1996.** Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. Immunity 4(3): 313-319.
 68. **Karlen S, Boer MLD, Lipscombe RJ, Lutz W, Mordvinov VA, Sanderson CJ. 1998.** Biological and molecular characteristics of interleukin-5 and its receptor. International reviews of immunology, 16(3-4), 227-247.
 69. **Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, Keegan AD. 2003.** Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. Science 300(5625): 1527-1528.
 70. **Kimura A, Kishimoto T. 2010.** IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. European journal of immunology. 40(7): 1830-1835.
 71. **Kole A, Maloy K. J. 2014.** Control of intestinal inflammation by interleukin-10. In Interleukin-10 in Health and Disease (pp. 19-38). Springer Berlin Heidelberg.
 72. **Konkel JE, Chen W. 2011.** Balancing acts: the role of TGF- β in the mucosal immune system. Trends in molecular medicine 17(11): 668-676.
 73. **Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Köhler G. 1993.** Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses.
 74. **Kouros-Mehr H, Kim JW, Bechis SK, Werb Z. 2008.** GATA-3 and the regulation of the mammary luminal cell fate. Current opinion in cell biology 20(2): 164-170.
 75. **Krakauer T, Fleischer B, Stevens DL, McClane BA, Stiles BG. 1997.** *Clostridium perfringens* enterotoxin lacks superantigenic activity but induces an interleukin-6 response from human peripheral blood mononuclear cells. Infection and immunity. 65(8): 3485-3488.
 76. **Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. 2012.** TGF-beta-an excellent servant but a bad master. J Transl Med, 10(1): 183.
 77. **Lawrence DA. 2001.** Latent-TGF- β : an overview. Molecular and cellular biochemistry 219(1-2): 163-170.

78. **Le Jan, C. (1996).** Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: a review. *Veterinary research*, 27(4-5), 403-417.
79. **Leder K, Weller PF. 2000.** Eosinophilia and helminthic infections. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 13(2): 301-317.
80. **León B, Ballesteros-Tato A, Lund FE. 2014.** Dendritic Cells and B Cells: Unexpected Partners in Th2 Development. *The Journal of Immunology*, 193(4): 1531-1537.
81. **Livak KJ y Schmittgen TD. 2001.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods*, 25: 402-408.
82. **Ludviksson BR, Seegers D, Resnick AS, Strober W. 2000.** The effect of TGF-beta1 on immune responses of naive versus memory CD4+ Th1/Th2 T cells. *Eur J Immunol* 30:2101–2111
83. **Luna L, Brandão PE, Maturrano L, Rosadio R, Silva FDF, Soares RM, Gregori F. 2015.** *Betacoronavirus* 1 in alpacas (*Vicugna pacos*) in the High Peruvian Andes. *Small Ruminant Research*, 133, 7-9.
84. **Luna L, Maturrano L, Rivera, H, Zanabria, V, Rosadio, R. 2012.** Genotipificación, evaluación toxigénica in vitro y sensibilidad a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de casos diarreicos y fatales en alpacas neonatas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(3): 280-288.
85. **Lynagh GR, Bailey M, Kaiser P. 2000.** Interleukin-6 is produced during both murine and avian *Eimeria* infections. *Veterinary immunology and immunopathology*. 76(1): 89-102.
86. **Maillot C, Gargala G, Delaunay A, Ducrotte P, Brasseur P, Ballet JJ, Favennec L. 2000.** *Cryptosporidium parvum* infection stimulates the secretion of TGF- β , IL-8 and RANTES by Caco-2 cell line. *Parasitology research*, 86(12): 947-949.
87. **Martínez-González MA, Sánchez-Villegas A, Fajardo AF. 2006.** Bioestadística amigable. 2da edición. Editorial Díaz de Santos. p: 419- 434.
88. **McCoy LE, Rutten L, Frampton D, Anderson I, Granger L, Bashford-Rogers R, Dekkers G, Strokappe NM, Seaman MS, Koh W, Grippo V, Kliche A, Verrips T, Kellam P, Fassati A, Weiss RA. 2014.** Molecular evolution of broadly neutralizing llama antibodies to the CD4-binding site of HIV-1. *PLoS Pathog*, 10(12): e1004552.

89. **Min B, Prout M, Hu-Li J, Zhu J, Jankovic D, Morgan ES, Urban JF, Dvorak AM, Finkelman FD, LeGros G, Paul WE. 2004.** Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *The Journal of experimental medicine* 200(4): 507-517.
90. **Molfino NA, Gossage D, Kolbeck R, Parker JM, Geba GP. 2012.** Molecular and clinical rationale for therapeutic targeting of interleukin-5 and its receptor. *Clinical & Experimental Allergy* 42(5): 712-737.
91. **Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001.** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* 19(1): 683-765.
92. **Moqbel R, Ying S, Barkans J, Newman TM, Kimmitt P, Wakelin M, Taborda-Barata L, Meng Q, Corrigan CJ, Durham SR, Kay AB. 1995.** Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *The Journal of Immunology* 155(10): 4939-4947.
93. **Morales S, Paredes D, Pezo D. 2007.** Asociación de *rotavirus* y *Escherichia coli* fimbriada como agentes causales de infecciones entéricas en alpacas neonatas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 18(2): 150-153.
94. **More J, Manchego A, Sandoval N, Ramírez M, Pezo D, Chiok KL, Rivera H. 2011.** Detección genómica y expresión de péptidos antimicrobianos (α -y β -defensinas) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(4), 324-335.
95. **More J. 2013.** Efecto de antígenos clostridiales con ácido retinoico sobre la expresión de citoquinas de la respuesta inmune humoral y celular de la mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis para optar el título de Magíster. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.
96. **Mori L, Perales R, Rodríguez J, Shiva C, Koga Y, Choquehuanca G, Palacios C. 2014.** Molecular Identification of Shiga-Toxin Producing and Enteropathogenic *Escherichia coli* (STEC and EPEC) in Diarrheic and Healthy Young Alpacas. *Advances in Microbiology*, 4(7): 5
97. **Mowat AM, Millington OR, Chirido FG. 2004.** Anatomical and cellular basis of immunity and tolerance in the intestine. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 39: S723-S724.

98. **Nakashima K, Taga T. 1998.** Gp130 and the IL-6 family of cytokines: signaling mechanisms and thrombopoietic activities. In *Seminars in hematology* (Vol. 35, No. 3, pp. 210-221).
99. **Nakayamada S, Takahashi H, Kanno Y, O'Shea JJ. 2012.** Helper T cell diversity and plasticity. *Current opinion in immunology* 24(3): 297-302.
100. **Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, Bucks C, Kane CM, Fallon PG, Pannell R, Jolin HE, McKenzie AN. 2010.** Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464(7293): 1367-1370.
101. **Odbileg R, Lee S, Ohashi K, Onuma M. 2005.** Cloning and sequence analysis of llama (*Lama glama*): Th2 (IL-4, IL-10 and IL-13) cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104 (3–4): 145–153.
102. **Ovington KS, Alleva LM, Kerr EA. 1995.** Cytokines and immunological control of *Eimeria* spp. *International journal for parasitology*. 25(11): 1331-1351.
103. **Palacios C. 2008.** Estudio caso control del *Cryptosporidium* como factor de riesgo en la diarrea neonatal en alpacas menores a 15 días. Tesis para optar el título de Magíster. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.
104. **Palm F, Kuhl J, Walter I, Budik S, Nagel C, Hirt R, Auer U, Eberspächer C, Aurich J. 2015.** Colostrum Withdrawal is Without Effect on Duodenal Development in Newborn Foals. *Journal of Equine Veterinary Science*.
105. **Pandolfi PP, Roth ME, Karis A, Leonard MW, Dzierzak E, Grosveld FG, Engel JD, Michael H, Lindenbaum MH. 1995.** Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nature genetics* 11(1): 40-44.
106. **Park LS, Friend D, Grabstein K, Urdal DL. 1987.** Characterization of the high-affinity cell-surface receptor for murine B-cell-stimulating factor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(6): 1669-1673.
107. **Paul WE, Zhu J. 2010.** How are TH2-type immune responses initiated and amplified?. *Nature Reviews Immunology* 10(4): 225-235.
108. **Paul WE. 2010.** What determines Th2 differentiation, in vitro and in vivo?. *Immunology and cell biology*, 88(3): 236-239.
109. **Paul WE. 2015.** History of interleukin-4. *Cytokine* [Internet], disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.038>

110. **Pérez D, Maturrano L, Rosadio R. 2012.** Genotipificación y subtipificación molecular de cepas de *Clostridium perfringens* aisladas en alpacas muertas por enterotoxemia. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 23(3): 272-279.
111. **Pérez H, Chávez A, Pinedo R, Leyva V. 2014.** Helmintiasis y eimeriasis en alpacas de dos comunidades de Cusco, Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 25(2): 245-253.
112. **Petry F, Jakobi V, Tessema TS. 2010.** Host immune response to *Cryptosporidium parvum* infection. Experimental parasitology. 126(3): 304-309.
113. **Pezo D. 2010.** Geografía de la producción de alpacas por pequeños productores en Perú. En: Cid, M. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense. 148 p.
114. **Prussin C, Yin Y, Upadhyaya B. 2010.** Th 2 heterogeneity: Does function follow form?. Journal of Allergy and Clinical Immunology 126(6): 1094-1098.
115. **Redpath SA, Heieis G, Perona-Wright G. 2015.** Spatial regulation of IL-4 signalling in vivo. Cytokine.
116. **Reed SG. 1999.** TGF- β in infections and infectious diseases. Microbes and Infection, 1(15), 1313-1325.
117. **Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl J, Ricciardi-Castagnoli, P. 2001.** Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat Immunol. 2: 361-7.
118. **Reyes J. 2015.** Determinación de la expresión de los genes de IgA y citoquinas asociadas IL 5, IL 6 y TGF β en mucosa intestinal de crías de alpacas (*vicugna pacos*) vacunadas con antígeno clostridial. Tesis para optar por el título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.
119. **Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997.** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Analytical biochemistry. 245(2): 154-160.
120. **Roca V, Manchego A, Sandoval N, Chiok KL, Rivera H. 2014.** Caracterización histológica y dinámica linfóide de las placas de Peyer en crías de alpaca durante los 45 primeros días de vida. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 25(3): 341-349.

121. **Rodríguez A, Casas E, Luna L, Gavidia C, Zanabria V, Rosadio R. 2012.** Eimeriosis en crías de alpacas: prevalencia y factores de riesgo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(3): 289-298.
122. **Romagnani S. 2000.** T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of allergy, asthma & immunology*, 85(1), 9-21.
123. **Rosadio R, Londoño P, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Llanco L, Yaya K, Maturrano L. 2010.** *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. *Vet Parasitol* 168: 116-120.
124. **Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Castillo H, Véliz A, Luna E, Yaya K, Londoño P. 2012.** Avances en el estudio de la patogénesis y prevención de la enterotoxemia de las alpacas. *Rev Inv Vet Perú* 23 (3):251-260.
125. **Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Luna E. 2012.** El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(3): 261-271.
126. **Round JL, Mazmanian SK. 2009.** The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(5): 313-323.
127. **Sahoo A, Alekseev A, Obertas L, Nurieva R. 2014.** Grail controls Th2 cell development by targeting STAT6 for degradation. *Nature communications* 5.
128. **Sanderson, C. J. 1992.** Interleukin 5, eosinophils and disease. *Blood* 79: 3101-3109.
129. **Saraiva M, O'Garra A. 2010.** The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology* 10(3): 170-181.
130. **Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. 2011.** The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1813(5): 878-888.
131. **Shoemaker J, Saraiva, M., & O'Garra, A. (2006).** GATA-3 directly remodels the IL-10 locus independently of IL-4 in CD4+ T cells. *The Journal of Immunology* 176(6) 3470-3479.
132. **Siuce J, Manchego A, Sandoval N, More J, Chiok KL, Pezo D, Rivera H. 2015.** Expresión de Defensinas en Yeyuno de Crías de Alpacas (*Vicugna pacos*) con Enteropatías. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(2): 317-327.
133. **Strobel S. 2001.** Immunity induced after a feed of antigen during early life: oral tolerance versus desensitisation. *Proc Nutr Soc* 60:437- 442.

134. **Swindle MM. 1998.** Surgery, Anesthesia and Experimental Techniques in Swine. Iowa State university Press.
135. **Takatsu K. 1998.** Interleukin 5 and B cell differentiation. Cytokine & growth factor reviews, 9(1): 25-35.
136. **Takatsu K. 2011.** Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences 87(8): 463.
137. **Tambillo L, Manchego A, Chiok, KL, Sandoval N, More J, Rivera H. 2013.** Evaluación in vitro de la respuesta leucocitaria de alpacas (*Vicugna pacos*) en presencia de antígenos clostridiales. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 24(4): 510-523.
138. **Tanaka, T, Kishimoto T. 2014.** The biology and medical implications of interleukin-6. Cancer immunology research 2(4): 288-294.
139. **Tao X, Constant S, Jorritsma P, Bottomly K. 1997.** Strength of TCR signal determines the co-stimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation. J. Immunol. 159: 5956–5963.
140. **Tindemans I, Serafini N, Di Santo JP, Hendriks RW. 2014.** GATA-3 Function in Innate and Adaptive Immunity. Immunity, 41(2): 191-206.
141. **Tizard IR. 2009.** Inmunología veterinaria. 8º ed. Barcelona: Elsevier. 246p.
142. **Tizard IR. 2013.** Veterinary Immunology. Ed. 9th. Elsevier Health Sciences. 153-155, 231p.
143. **Trifunović J, Miller L, Debeljak Ž, Horvat V. 2015.** Pathologic patterns of interleukin 10 expression—A review. Biochemia medica 25(1): 36.
144. **Tuovinen E, Keto J, Nikkilä J, Mättö J, Lähteenmäki K. 2013.** Cytokine response of human mononuclear cells induced by intestinal *Clostridium* species. *Anaerobe*, 19, 70-76.
145. **Villacorta C, López T, González A, Gómez L. 2009.** Evaluación de *Cryptosporidium parvum* como factor de riesgo para la presentación de diarrea neonatal en alpacas en Cusco. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 20(2): 277-284.
146. **Volk HD, Asadullah K, Gallagher G, Sabat R, Grütz G. 2001.** IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic agents. Trends in immunology 22(8): 414-417.

147. **Walle KV, Vanrompay D, Cox E. 2013.** Bovine innate and adaptive immune responses against *Escherichia coli* O157: H7 and vaccination strategies to reduce faecal shedding in ruminants. *Veterinary immunology and immunopathology*. 152(1): 109-120.
148. **Walsh KP, Mills KH. 2013.** Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends in immunology* 34(11): 521-530.
149. **Wan YY. 2014.** **GATA3:** a master of many trades in immune regulation. *Trends in immunology*, 35(6): 233-242.
150. **Wang L, Walia B, Evans J, Gewirtz AT, Merlin D, Sitaraman SV. 2003.** IL-6 induces NF- κ B activation in the intestinal epithelia. *The Journal of Immunology*. 171(6): 3194-3201.
151. **Watanabe, R, Manchego A, Rivera H. 2014.** Expresión In vitro de las interleucinas 2 y 10 de linfocitos de alpacas (*Vicugna pacos*) en presencia de antígenos clostridiales. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(3): 419-429.
152. **Watanabe R. 2016.** Respuesta inmune celular en la mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*) clínicamente sanas. Tesis para optar el título de Magíster. Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.
153. **Weaver DM, Tyler JW, Scott MA, Wallace LM, Marion RS, Holle JM. 2000.** Passive transfer of colostral immunoglobulin G in neonatal llamas and alpacas. *American journal of veterinary research*, 61(7): 738-741.
154. **Wernery U. 1995.** blutparameter und enzyme werte von gesunden und kranken rennkamelen (*Camelus dromedarius*). *Tierärztl. Prax.* 23: 187-191.
155. **Whitehead C. 2009.** Management of Neonatal Llamas and Alpacas. *Vet Clin Food Anim.* 25: 353-366.
156. **Whiteside TL. 2012.** What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why?. In *Seminars in cancer*. Academic Press p. 327-334.
157. **Worthington JJ, Czajkowska BI, Melton AC, Travis MA. 2011.** Intestinal dendritic cells specialize to activate transforming growth factor- β and induce Foxp3+ regulatory T cells via integrin α v β 8. *Gastroenterology*, 141(5), 1802-1812.
158. **Wynn TA. 2015.** Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. *Nature Reviews Immunology*. 15(5): 271-282. **Kusugami K, Fukatsu A, Tanimoto M, Shinoda M, Haruta JI, Kuroiwa A, Ina K, Kanayama K, Ando T, Yamaguchi,**

- T. 1995.** Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage- and epithelial cell-dependent. *Digestive diseases and sciences*. 40(5): 949-959.
159. **Yamane H, Zhu J, Paul WE. 2005.** Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4⁺ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *The Journal of experimental medicine* 202(6): 793-804.
 160. **Zhou L, Chong MM, Littman DR. 2009.** Plasticity of CD4⁺ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* 30.5: 646-655.
 161. **Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. 2007.** IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature immunology* 8(9): 967-974.
 162. **Zhou P, Li E, Zhu N, Robertson J, Nash T, Singer SM. 2003.** Role of interleukin-6 in the control of acute and chronic *Giardia lamblia* infections in mice. *Infection and immunity*. 71(3): 1566-1568.
 163. **Zhu J, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. 2003.** Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity*, 19(5): 739-748.
 164. **Zhu J, Min B, Hu-Li J, Watson CJ, Grinberg A, Wang Q, Killeen N, Urban Jr, Guo L, Paul WE. 2004.** Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in TH1-TH2 responses. *Nature immunology*, 5(11): 1157-1165.
 165. **Zhu J, Paul WE. 2008.** CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5): 1557-1569.
 166. **Zhu J, Yamane H, Paul W E .2010.** Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annual review of immunology* 28: 445.
 167. **Zhu J. 2010.** Transcriptional regulation of Th2 cell differentiation. *Immunology and cell biology* 88(3): 244-249.

IX. ANEXOS

Cuadro A1. Resultados de la cuantificación relativa de IL-4 de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador

	EDAD	CT IL-4	Tm	CT GAPDH	2 ^{-ΔΔCt}	PROMED IO	DS	CV
GRUPO CALIBRADOR	Feto 11 meses	40	82.8	23.83	1			
GRUPO 1	2 días	35.45	82.8	20.69	2.66	2.48	0.26	0.10
	3 días	36.76	82.8	21.72	2.18			
	5 días	35.25	82.8	20.17	2.13			
	7 días	34.32	83.0	19.63	2.79			
	7 días	34.80	82.3	20.00	2.59			
	8 días	34.91	83.0	20.05	2.48			
GRUPO 2	10 días	34.74	82.8	21.75	9.06	8.59	0.30	0.03
	13 días	33.97	82.8	20.87	8.42			
	14 días	NA*						
	19 días	35.06	82.8	21.94	8.29			
	20 días	34.21	82.3	21.13	8.52			
	21 días	33.11	82.3	20.07	8.76			
GRUPO 3	26 días	33.77	83.0	20.27	6.34	6.58	0.48	0.07
	38 días	33.79	82.3	20.34	6.58			
	39 días	32.98	82.8	19.64	7.09			
	41 días	33.81	82.3	20.31	6.34			
	47 días	36.37	83.0	22.77	5.94			
	47 días	32.40	83.0	19.07	7.18			

NA*= No se detectó ARNm IL-4.

DS= Desviación estándar.

CV= Coeficiente variación.

Cuadro A2. Resultados de la cuantificación relativa de IL-5 de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador

	EDAD	CT IL-5	Tm	CT GAPDH	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	PROMEDIO	DS	CV
GRUPO CALIBRADOR	Feto 11 meses	35.99	75.1	23.83	1			
GRUPO 1	2 días	31.86	75.1	20.65	1.94	2.15	0.13	0.06
	3 días	32.91	75.4	21.95	2.30			
	5 días	32.75	75.1	21.73	2.20			
	7 días	32.62	75.1	21.51	2.08			
	7 días	33.72	75.4	22.70	2.22			
	8 días	32.48	75.0	21.41	2.14			
GRUPO 2	10 días	32.55	75.4	21.79	2.65	2.65	0.11	0.04
	13 días	30.86	75.4	20.21	2.86			
	14 días	31.23	74.9	20.48	2.67			
	19 días	32.67	75.4	21.89	2.61			
	20 días	32.30	75.1	21.51	2.59			
	21 días	31.82	75.1	20.98	2.51			
GRUPO 3	26 días	31.86	75.1	20.95	2.38	2.44	0.10	0.04
	38 días	32.11	75.4	21.31	2.57			
	39 días	32.78	74.9	21.82	2.30			
	41 días	32.48	75.4	21.55	2.40			
	47 días	31.78	75.0	20.91	2.46			
	47 días	31.87	75.4	21.10	2.64			

DS= Desviación estándar.

CV= Coeficiente variación.

Cuadro A3. Resultados de la cuantificación relativa de IL-6 de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador

	EDAD	CT IL-6	Tm	CT GAPDH	$2^{-\Delta\Delta} Ct$	PROMEDIO	DS	CV
GRUPO CALIBRADOR	Feto 11 meses	34.40	78.5	23.83	1			
GRUPO 1	2 días	28.36	78.5	20.17	5.25	5.04	1.06	0.21
	3 días	29.10	78.8	20.45	3.80			
	5 días	28.61	78.8	20.54	5.67			
	7 días	28.22	78.8	20.13	5.58			
	7 días	31.66	78.8	22.92	3.56			
	8 días	27.64	78.5	19.69	6.17			
GRUPO 2	10 días	27.39	78.5	20.01	9.14	8.00	1.10	0.14
	13 días	30.83	79.0	22.89	6.22			
	14 días	29.46	78.8	21.95	8.35			
	19 días	30.34	79.0	22.67	7.48			
	20 días	28.17	78.8	20.64	8.24			
	21 días	28.25	79.0	20.85	9.02			
GRUPO 3	26 días	28.92	79.0	21.57	9.33	10.60	1.29	0.12
	38 días	28.19	78.8	21.21	12.10			
	39 días	28.75	78.8	21.38	9.24			
	41 días	28.01	79.0	20.78	10.14			
	47 días	29.31	78.8	22.13	10.54			
	47 días	27.89	78.8	20.91	12.09			

DS= Desviación estándar.

CV= Coeficiente variación.

Cuadro A4. Resultados de la cuantificación relativa de IL-10 de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador

	EDAD	CT IL-10	Tm	CT GAPDH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	PROMEDIO	DS	CV
GRUPO CALIBRADOR	Feto 11 meses	31.28	83.8	23.83	1			
GRUPO 1	2 días	24.75	83.8	20.40	8.58	7.21	1.02	0.14
	3 días	23.75	83.4	19.30	8.04			
	5 días	24.57	83.6	19.97	7.23			
	7 días	23.81	83.6	19.10	6.69			
	7 días	26.18	83.8	21.40	6.36			
	8 días	26.48	83.0	21.70	6.40			
GRUPO 2	10 días	24.63	83.4	21.10	15.22	13.53	1.26	0.09
	13 días	24.58	83.7	20.92	13.86			
	14 días	24.49	83.1	20.79	13.49			
	19 días	25.50	83.4	21.60	11.76			
	20 días	24.17	83.3	20.50	13.77			
	21 días	23.35	83.6	19.60	13.07			
GRUPO 3	26 días	23.13	83.8	19.91	18.65	18.77	1.48	0.08
	38 días	24.28	83.7	20.99	18.06			
	39 días	23.49	83.8	20.30	19.25			
	41 días	23.74	83.7	20.50	18.55			
	47 días	25.88	83.1	22.51	16.83			
	47 días	22.74	83.7	19.70	21.31			

DS= Desviación estándar.

CV= Coeficiente variación.

Cuadro A5. Resultados de la cuantificación relativa de TGF- β de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador

	EDAD	CT TGF- β	Tm	CT GAPDH	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	PROMEDIO	DS	CV
GRUPO CALIBRADOR	Feto 11 meses	30.39	85.4	23.83	1			
GRUPO 1	2 días	25.28	84.8	20.01	2.43	2.18	0.23	0.11
	3 días	27.23	85.4	21.70	2.06			
	5 días	27.67	84.8	22.01	1.86			
	7 días	27.02	84.8	21.50	2.07			
	7 días	26.28	85.4	21.11	2.44			
	8 días	26.71	84.8	21.12	2.25			
GRUPO 2	10 días	27.13	84.8	22.19	3.09	3.03	0.18	0.06
	13 días	27.75	84.8	22.72	2.91			
	14 días	26.34	84.8	21.44	3.17			
	19 días	26.98	84.8	21.84	2.69			
	20 días	26.04	85.1	21.15	3.20			
	21 días	25.43	84.8	20.52	3.15			
GRUPO 3	26 días	24.70	84.8	20.14	4.00	4.06	0.15	0.04
	38 días	26.20	85.4	21.56	3.80			
	39 días	26.42	85.4	21.90	4.12			
	41 días	26.09	84.8	21.61	4.24			
	47 días	26.48	85.4	21.95	4.09			
	47 días	26.41	84.5	21.89	4.13			

DS= Desviación estándar.

CV= Coeficiente variación.

Cuadro A6. Resultados de la cuantificación relativa de GATA3 de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpacas sanas con respecto al calibrador

	EDAD	CT GATA3	Tm	CT GAPDH	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	PROME DIO	DS	CV
GRUPO CALIBRADOR	Feto 11 meses	29.25	86.1	23.83	1			
GRUPO 1	2 días	26.45	86.1	21.30	1.21	1.24	0.12	0.10
	3 días	28.01	85.9	22.94	1.28			
	5 días	27.20	85.4	21.83	1.03			
	7 días	27.39	85.8	22.43	1.38			
	7 días	26.90	85.8	21.88	1.33			
	8 días	27.32	85.5	22.18	1.22			
GRUPO 2	10 días	26.55	85.8	22.01	1.84	1.56	0.16	0.10
	13 días	26.89	85.6	22.11	1.56			
	14 días	27.57	85.3	22.73	1.49			
	19 días	26.96	85.6	22.29	1.69			
	20 días	26.42	85.6	21.50	1.42			
	21 días	25.43	85.8	20.49	1.39			
GRUPO 3	26 días	24.60	85.6	19.69	1.42	1.16	0.13	0.11
	38 días	26.53	85.6	21.30	1.14			
	39 días	25.59	85.8	20.29	1.09			
	41 días	26.48	85.9	21.23	1.13			
	47 días	26.02	85.6	20.72	1.09			
	47 días	25.76	85.9	20.55	1.16			

DS= Desviación estándar.

CV= Coeficiente variación.

Cuadro A7. Resultados del estudio histopatológico de las muestras de mucosa intestinal de crías de alpaca clínicamente sanas con tinción H:E.

N° Muestra	IDENTIFICA CION	EDAD	SEXO	RAZA	DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO
1	Alp 01- 2013	2 días	Macho	Suri	Sin Lesiones Aparentes
2	Alp 19- 2013	3 días	Macho	Suri	Sin Lesiones Aparentes
3	Alp 20- 2013	5 días	Hembra	Huacaya	Sin Lesiones Aparentes
4	Alp 08- 2013	7 días	Hembra	Huacaya	Sin Lesiones Aparentes
5	Alp 21- 2013	7 días	Macho	Huacaya	Sin Lesiones Aparentes
6	Alp 22- 2013	8 días	Macho	Huacaya	Leve Enteritis Catarral Aguda Difusa
7	Alp 23- 2013	10 días	Macho	Huacaya	Sin Lesiones Aparentes
8	Alp 24- 2013	13 días	Hembra	Huacaya	Leve Enteritis Catarral Aguda Difusa
9	Alp 06- 2013	14 días	Macho	Huacaya	Leve Enteritis Catarral Aguda Difusa
10	Alp 27- 2013	19 días	Hembra	Huacaya	Leve Enteritis Catarral Aguda Difusa
11	Alp 28- 2013	20 días	Macho	Huacaya	Leve Enteritis Catarral Aguda Difusa
12	Alp 26- 2013	21 días	Hembra	Huacaya	Sin Lesiones Aparentes
13	Alp 25- 2013	26 días	Hembra	Huacaya	Sin Lesiones Aparentes
14	Alp 11- 2013	38 días	Macho	Huacaya	Leve Enteritis Catarral Aguda Difusa
15	Alp 13- 2013	39 días	Macho	Suri	Leve Enteritis Catarral Aguda Difusa
16	Alp 09- 2013	41 días	Hembra	Suri	Leve Enteritis Catarral Aguda Difusa
17	Alp 10- 2013	47 días	Hembra	Huacaya	Leve Enteritis Catarral Aguda Difusa
18	Alp 12- 2013	47 días	Macho	Huacaya	Leve Enteritis Catarral Aguda Difusa


```
. swilk il4
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
il4	16	0.84680	3.104	2.250	0.01223

```
. oneway il4 grupoetario, bonferroni
```

```
. kwallis il4, by(grupoetario)
```

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

grupoe~o	Obs	Rank Sum
1	6	21.00
2	5	75.00
3	6	57.00

```
chi-squared = 14.235 with 2 d.f.
probability = 0.0008
```

```
chi-squared with ties = 14.235 with 2 d.f.
probability = 0.0008
```

```
. ranksum il4, by(grupoetario)
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

grupoetario	obs	rank sum	expected
1	6	21	36
2	5	45	30
combined	11	66	66

```
unadjusted variance 30.00
adjustment for ties 0.00
adjusted variance 30.00
```

```
Ho: il4(grupoe~o==1) = il4(grupoe~o==2)
z = -2.739
Prob > |z| = 0.0062
```

```
. di 0.0062*3
.0186
```

```

. ranksum il4, by(grupoetario)

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test



| grupoetario | obs | rank sum | expected |
|-------------|-----|----------|----------|
| 2           | 5   | 45       | 30       |
| 3           | 6   | 21       | 36       |
| combined    | 11  | 66       | 66       |



unadjusted variance            30.00
adjustment for ties            0.00
-----
adjusted variance            30.00

Ho: il4(grupoe~o==2) = il4(grupoe~o==3)
      z =    2.739
     Prob > |z| =   0.0062

. di 0.0062*3
.0186

. ranksum il4, by(grupoetario)

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test



| grupoetario | obs | rank sum | expected |
|-------------|-----|----------|----------|
| 1           | 5   | 15       | 30       |
| 3           | 6   | 51       | 36       |
| combined    | 11  | 66       | 66       |



unadjusted variance            30.00
adjustment for ties            0.00
-----
adjusted variance            30.00

Ho: il4(grupoe~o==1) = il4(grupoe~o==3)
      z =   -2.739
     Prob > |z| =   0.0062

. di 0.0062*3
.0186

```

Figura A1. Resultados software STATA 11: Prueba de Shapiro wilk, Kruskal - Wallis y U de Mann – Whitney para IL-4 en los diferentes grupos Etarios

```
. swilk il5
```

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
il5	17	0.97344	0.561	-1.152	0.87540

```
. oneway il5 grupoetario, bonferroni
```

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.673474368	2	.336737184	25.55	0.0000
Within groups	.184505526	14	.013178966		
Total	.857979894	16	.053623743		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 0.3551 Prob>chi2 = 0.837

Comparison of IL5 by GRUPO ETARIO (Bonferroni)		
Row Mean- Col Mean	Grupo 1	Grupo 2
Grupo 2	.491269 0.000	
Grupo 3	.286 0.002	-.205268 0.031

Figura A2. Resultados software STATA 11: Prueba de Shapiro wilk, ANOVA y Bonferroni para IL-5 en los diferentes grupos Etarios

```
. swilk il6
```

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
il6	16	0.96205	0.769	-0.522	0.69904

```
. oneway il6 grupoetario, bonferroni
```

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	77.3940116	2	38.6970058	29.36	0.0000
Within groups	17.1355415	13	1.31811858		
Total	94.5295532	15	6.30197021		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 0.1622 Prob>chi2 = 0.922

Comparison of IL6 by GRUPO ETARIO (Bonferroni)		
Row Mean- Col Mean	Grupo 1	Grupo 2
Grupo 2	2.96656 0.003	
Grupo 3	5.55924 0.000	2.59269 0.008

Figura A3. Resultados software STATA 11: Prueba de Shapiro wilk, ANOVA y Bonferroni para IL-6 en los diferentes grupos Etarios

```
. swilk il10
```

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
il10	16	0.92027	1.616	0.953	0.17038

```
. oneway il10 grupoetario, bonferroni
```

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	364.667081	2	182.33354	109.70	0.0000
Within groups	21.6073239	13	1.66210184		
Total	386.274405	15	25.751627		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 0.5201 Prob>chi2 = 0.771

Comparison of IL10 by GRUPO ETARIO
(Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	Grupo 1	Grupo 2
Grupo 2	6.32284 0.000	
Grupo 3	11.5633 0.000	5.2405 0.000

Figura A4. Resultados software STATA 11: Prueba de Shapiro wilk, ANOVA y Bonferroni para IL-10 en los diferentes grupos Etarios

```
. swilk tgfb
```

Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
tgfb	16	0.91097	1.804	1.172	0.12065

```
. oneway tgfb grupoetario, bonferroni
```

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	9.68727415	2	4.84363708	128.81	0.0000
Within groups	.488833824	13	.037602602		
Total	10.176108	15	.678407199		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 0.7632 Prob>chi2 = 0.683

Comparison of TGFB by GRUPO ETARIO
(Bonferroni)

Row Mean- Col Mean	Grupo 1	Grupo 2
Grupo 2	.854559 0.000	
Grupo 3	1.88467 0.000	1.03011 0.000

Figura A5. Resultados software STATA 11: Prueba de Shapiro wilk, ANOVA y Bonferroni para TGF- β en los diferentes grupos Etarios

. swilk gata3					
Shapiro-Wilk W test for normal data					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
gata3	18	0.89987	2.201	1.579	0.05717
. oneway gata3 grupoetario, bonferroni					
Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.533597109	2	.266798555	12.79	0.0006
Within groups	.312948495	15	.020863233		
Total	.846545604	17	.0497968		
Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 0.5044 Prob>chi2 = 0.777					
Comparison of GATA3 by GRUPO ETARIO (Bonferroni)					
Row Mean- Col Mean	Grupo 1	Grupo 2			
Grupo 2	.317587 0.005				
Grupo 3	-.081525 1.000	-.399112 0.001			

Figura A6. Resultados software STATA 11: Prueba de Shapiro wilk, ANOVA y Bonferroni para GATA3 en los diferentes grupos Etarios